

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA-FÍSICA APLICADA



**DESARROLLO DE MÉTODOS ANALÍTICOS AVANZADOS PARA  
LA DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ORGANISMOS  
MODIFICADOS GENÉTICAMENTE**



**CARLOS LEÓN CANSECO**

INSTITUTO DE FERMENTACIONES INDUSTRIALES  
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

Tesis Doctoral  
Madrid, 2010



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA-FÍSICA

**DESARROLLO DE MÉTODOS ANALÍTICOS AVANZADOS PARA  
LA DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ORGANISMOS  
MODIFICADOS GENÉTICAMENTE**

Memoria presentada por:

**CARLOS LEÓN CANSECO**

Para optar al grado de:

**DOCTOR EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS**

INSTITUTO DE FERMENTACIONES INDUSTRIALES  
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

Trabajo realizado bajo la dirección de:

**Dr. Alejandro Cifuentes Gallego**  
**Dra. Virginia García Cañas**

*Instituto de Fermentaciones Industriales, CSIC  
(actualmente Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación, CIAL).*





MINISTERIO  
DE CIENCIA  
E INNOVACIÓN



**ALEJANDRO CIFUENTES GALLEGO, PROFESOR DE INVESTIGACIÓN  
DEL INSTITUTO DE FERMENTACIONES INDUSTRIALES DEL CSIC Y  
VIRGINIA GARCÍA CAÑAS, CIENTÍFICO TITULAR DEL INSTITUTO DE  
FERMENTACIONES INDUSTRIALES DEL CSIC**

CERTIFICAN,

Que la presente Memoria titulada “DESARROLLO DE METODOS ANALÍTICOS AVANZADOS PARA LA DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ORGANISMOS MODIFICADOS GENÉTICAMENTE” que presenta **Carlos León Canseco**, Licenciado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos por la Universidad Autónoma de Madrid, ha sido realizada bajo su dirección en el Departamento de Caracterización de Alimentos del Instituto de Fermentaciones Industriales del CSIC.

Y para que conste firmamos el presente certificado a 13 de Septiembre de 2010.

Dr. Alejandro Cifuentes Gallego

Dra. Virginia García Cañas



“Caminante no hay camino, se hace camino al andar”

Antonio Machado





## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría dar las gracias a mis Directores de Tesis, el Dr. Alejandro Cifuentes y la Dra. Virginia García Cañas. Aunque suene a tópico, sin ellos no habría sido posible realizar todo este trabajo. Les estoy muy agradecido por enseñarme tantas cosas durante estos años, y por formarme con muchísima paciencia y rigor. Pero sobre todo por demostrarme cada día que no solo son buenos científicos, sino ante todo, buenas personas.

A todos los integrantes de mi grupo, tanto los que están ahora, como los que han pasado por aquí. Con todos ellos he estado muy a gusto trabajando. Empezando por la Dra Elena Ibañez, que fue la que me trajo aquí desde la UAM, y siguiendo por los que estáis y habéis estado ayudando en lo que fuera, siempre con una sonrisa: Carol, Miguel, Jose, Irene, Meri, Pepe, Clara, Marina. La verdad es que tengo la suerte de estar en un gran equipo de trabajo.

Tampoco puedo olvidar a todas las personas que en uno u otro momento han pasado por este laboratorio, y que no sólo me han ayudado en la realización de esta Tesis, sino que me han aportado muchas experiencias y puntos de vista de diversas partes del mundo: Guillaume, Alessandro, Roci, Tuuli, Michel, Elena, Toñi, Monde, Vera, Shorena, Luci, Temir, Mustafa.

Por supuesto, he de dar las gracias también a todo el personal del Instituto de Fermentaciones Industriales y, en su nombre, a su Directora la Dra. Lourdes Amigo, por su grandísima acogida, y por las facilidades que me han dado en todo momento para desarrollar mi trabajo. También en especial a todos los amigos de este Instituto con los que he compartido muchos momentos durante las horas de trabajo. No voy a decir nombres, porque seguro que me dejo a mucha gente, pero si estás leyendo esto, estás entre ellos.

Otro aspecto destacable de estos años es la gran oportunidad que me ha ofrecido este grupo para conocer otros países y formas de trabajo. Quiero agradecer al Dr. Phillip Schmitt-Kopplin y a toda la gente del Institute für Ökologische Chemie de Munich su

gran acogida (y en especial a Agi y Marianna), al Dr. Vaclav Kasicka y la Dra Petra Sazelova de la Academia de Ciencias Checa, por su cordialidad y amabilidad y al Dr Mikkel Kaljurand y la Dra Maria Borissova por abrirme las puertas de su grupo en la Tallinna Tehnikaülikool.

También quiero agradecer a la Comunidad Autónoma de Madrid la concesión de un contrato de formación de personal investigador, y a la Sección Departamental de Ciencias de la Alimentación de la Universidad Autónoma de Madrid por el programa de Doctorado.

Finalmente, y no por ello menos importante, he de agradecer a mis padres, porque gracias a la educación que me han dado, he podido llegar hasta aquí. A mis hermanos, porque sé que somos la envidia de cualquier familia. A mi abuelo, que le hace tantísima ilusión que haya un nuevo doctor. A mis futuros “primos doctores”, que aun en la lejanía se preocupan constantemente por mí. Por supuesto, a mis amigos. A la mayoría de ellos esto les suena a chino, pero continúan interesándose por lo que hago, y demostrándome su apoyo en todo momento. Al pesao de Juan, porque si no le pongo en los agradecimientos me lo estará recordando toda la vida (ya que para su desgracia seguiremos siendo amigos toda la vida). A todas las asociaciones de las que formo parte (scout, fighet, KDPMP), sin cuya existencia, sería un poco menos feliz. Y a peste, aunque he tenido que poner peste, para no poner “esa” palabra que tan poco me gusta, porque siempre estas ahí, y siempre lo estarás.

MUCHAS GRACIAS

## **ÍNDICE**



# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	<b>VII</b>
<b>ENGLISH SUMMARY</b> .....	<b>XIII</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>XIX</b>
<b>CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN Y OBJETIVO</b> .....	<b>1</b>
1.1 ALIMENTOS TRANSGÉNICOS .....	3
1.2 TECNOLOGÍA DEL ADN RECOMBINANTE .....	3
1.3 CARACTERÍSTICAS DE LOS ALIMENTOS TRANSGÉNICOS .....	5
1.4 SITUACIÓN ACTUAL DE LOS ALIMENTOS TRANSGÉNICOS .....	7
1.5 ASPECTOS CONTROVERTIDOS DE LOS OMGs.....	9
1.6 NORMATIVA SOBRE OMGs .....	10
1.7 ANÁLISIS AVANZADO DE OMGs.....	13
1.7.1 Análisis de compuestos diana .....	14
1.7.2. Análisis de perfiles de compuestos o “profiling” .....	20
1.7.2.1. Transcriptómica.....	23
1.7.2.2. Proteómica.....	24
1.7.2.3. Metabolómica.....	28
1.8 PERSPECTIVAS FUTURAS EN EL ANÁLISIS DE ALIMENTOS TRANSGÉNICOS.....	33
1.9. OBJETIVO GENERAL .....	34
<b>CAPÍTULO II: DETECCIÓN DE LEVADURAS MODIFICADAS GENÉTICAMENTE EN VINO MEDIANTE EL USO COMBINADO DE PCR-MÚLTIPLE Y CGE-LIF</b> .....	<b>37</b>
2.1. INTRODUCCIÓN .....	39
2.2. OBJETIVO Y PLAN DE TRABAJO .....	41
2.3. MATERIALES Y MÉTODOS .....	41
2.3.1. Reactivos y muestras.....	41
2.3.2. Extracción de ADN de levadura .....	43
2.3.2.1. Cultivos de levadura .....	43
2.3.2.2. Muestras de vino .....	44
2.3.3. Amplificación de secuencias de ADN mediante PCR .....	46
2.3.3.1. Diseño de cebadores .....	46
2.3.3.2. Composición de la mezcla de reacción.....	46
2.3.3.3. Programa de termociclado .....	47
2.3.4. Separación de mezclas de ADN .....	47
2.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	48
2.4.1. Optimización del método de extracción de ADN de levadura en muestras de vino.....	48
2.4.2. Diseño y optimización de la PCR múltiple para la detección de la cepa transgénica EKD-13 .....	51
2.4.3. Análisis de las muestras de vino mediante el método combinado PCR-múltiple y CGE-LIF.....	55

2.5. CONCLUSIONES.....	57
<b>CAPÍTULO III: ESTUDIO DE LA FRACCIÓN PROTEICA, CORRESPONDIENTE A LAS ZEÍNAS, EN MUESTRAS DE MAÍZ TRANSGÉNICO Y CONVENCIONAL MEDIANTE CE-ESI-IT-MS Y CE-ESI-TOF-MS.....</b>	<b>59</b>
3.1. INTRODUCCIÓN.....	61
3.1.1. <i>Electroforesis capilar</i> .....	61
3.1.2. <i>Acoplamiento electroforesis capilar-espectrometría de masas (CE-MS)</i> .....	61
3.1.3. <i>Análisis de perfiles de proteínas de maíz</i> .....	63
3.2. OBJETIVO Y PLAN DE TRABAJO .....	63
3.3. MATERIALES Y MÉTODOS .....	64
3.3.1. <i>Muestras y reactivos</i> .....	64
3.3.2. <i>Extracción de las zeínas de maíz</i> .....	65
3.3.3. <i>Análisis de los extractos de proteínas</i> .....	65
3.3.4. <i>Tratamiento de los resultados</i> .....	67
3.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	67
3.4.1. <i>Extracción de la fracción de zeínas de semillas de maíz</i> .....	67
3.4.2. <i>Optimización de los parámetros instrumentales en CE-ESI-IT-MS y CE-ESI-TOF-MS</i> .....	68
3.4.3. <i>Análisis de la fracción proteica, correspondiente a las zeínas, en extractos de maíz convencional y transgénico</i> .....	76
3.5. CONCLUSIONES.....	78
<b>CAPÍTULO IV: EMPLEO DE CICLODEXTRINAS MODIFICADAS COMO SELECTORES QUIRALES EN CE-LIF Y CE-ESI-TOF-MS PARA EL ANÁLISIS QUIRAL DE AMINOÁCIDOS EN MUESTRAS DE SOJA TRANSGÉNICA Y CONVENCIONAL .....</b>	<b>79</b>
4.1. INTRODUCCIÓN.....	81
4.1.1. <i>Separación quiral en CE-MS</i> .....	81
4.2. OBJETIVO Y PLAN DE TRABAJO .....	83
4.3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	84
4.3.1. <i>Muestras y reactivos</i> .....	84
4.3.2. <i>Extracción y derivatización de los aminoácidos de soja y de vinagre</i> .....	86
4.3.3. <i>Condiciones de separación mediante CE-LIF</i> .....	87
4.3.4. <i>Análisis de D/L-aminoácidos mediante CE-ESI-TOF-MS</i> .....	87
4.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	88
4.4.1. <i>Estudio comparativo de los selectores quirales</i> .....	88
4.4.2. <i>Estudio comparativo de las cinco ciclodextrinas como selectores quirales en el análisis de aminoácidos patrón mediante CE-LIF</i> .....	89
4.4.3. <i>Empleo de CD3NH<sub>2</sub> como selector quiral en el tampón de separación para el análisis de D/L-aminoácidos mediante CE-ESI-TOF-MS</i> .....	92
4.4.4. <i>Análisis de aminoácidos quirales en muestras reales mediante CE-ESI-TOF-MS</i> .....	95
4.5. CONCLUSIONES.....	98

**CAPÍTULO V: ESTUDIO DE LOS PERFILES METABÓLICOS DE SOJA TRANSGÉNICA Y SOJA CONVENCIONAL MEDIANTE EL EMPLEO DE CE-ESI-TOF-MS.....99**

5.1. INTRODUCCIÓN .....	101
5.2. OBJETIVO Y PLAN DE TRABAJO .....	102
5.3. MATERIALES Y MÉTODOS .....	102
5.3.1. <i>Reactivos y muestras</i> .....	102
5.3.2. <i>Extracción de los metabolitos de soja</i> .....	103
5.3.3. <i>Optimización de la separación de los extractos de soja</i> .....	104
5.3.4. <i>Análisis de los perfiles metabólicos en extractos de soja mediante CE-ESI-TOF-MS</i> .....	104
5.3.5. <i>Tratamiento de los resultados</i> .....	105
5.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	105
5.4.1. <i>Optimización del método de extracción de metabolitos en muestras de soja</i> .....	105
5.4.2. <i>Optimización de las condiciones de la separación de los metabolitos de soja mediante CE-UV</i> .....	107
5.4.3. <i>Optimización de las condiciones de análisis de los metabolitos de soja mediante CE-ESI-TOF-MS</i> .....	109
5.4.4. <i>Identificación tentativa de compuestos</i> .....	112
5.4.5. <i>Comparación entre soja transgénica y convencional</i> .....	116
5.5. CONCLUSIONES.....	119

**CAPÍTULO VI: ESTUDIO DE LOS PERFILES METABÓLICOS DE MAÍZ TRANSGÉNICO Y MAÍZ CONVENCIONAL MEDIANTE EL EMPLEO DE CE-ESI-TOF-MS Y FT-ICR-MS .....121**

6.1. INTRODUCCIÓN.....	123
6.2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO .....	124
6.3. MATERIALES Y MÉTODOS .....	125
6.3.1. <i>Reactivos y muestras</i> .....	125
6.3.2. <i>Procedimientos de extracción de metabolitos de maíz</i> .....	126
6.3.2.1. <i>Extracción mediante ultrasonidos</i> .....	126
6.3.2.2. <i>Extracción con líquidos presurizados</i> .....	127
6.3.3. <i>Análisis de los extractos de metabolitos</i> .....	127
6.3.4. <i>Tratamiento estadístico de los resultados</i> .....	129
6.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	131
SECCIÓN I. ANÁLISIS COMPARATIVO DE LOS PERFILES METABÓLICOS DE MAÍZ TRANSGÉNICO Y CONVENCIONAL MEDIANTE CE-ESI-TOF-MS .....	131
6.4.1. <i>Estudio comparativo de varios métodos de extracción de metabolitos empleando ultrasonidos. Optimización de las condiciones de extracción</i> .....	131
6.4.2. <i>Optimización de las condiciones de separación y detección de los metabolitos de maíz mediante CE-ESI-TOF-MS</i> .....	133
6.4.3. <i>Análisis de los perfiles de metabolitos en extractos de maíz transgénico y convencional mediante CE-ESI-TOF-MS</i> .....	134
6.4.4. <i>Análisis de componentes principales</i> .....	142

SECCIÓN II. ANÁLISIS METABOLÓMICO DE MAÍZ TRANSGÉNICO Y CONVENCIONAL MEDIANTE EL EMPLEO COMBINADO DE FT-ICR-MS, CE-ESI-TOF-MS Y PLE .....	144
6.4.5. <i>Análisis de los extractos de metabolitos mediante FT-ICR-MS</i> .....	144
6.4.6. <i>Análisis comparativo de los perfiles metabólicos de maíz mediante análisis multivariante.</i>	147
6.4.7. <i>Análisis de perfiles metabólicos en maíz transgénico y convencional mediante CE-ESI-TOF-MS y FT-ICR-MS</i> .....	150
6.4.8. <i>Análisis de perfiles metabólicos en maíz transgénico y convencional mediante PLE y FT-ICR-MS</i> .....	155
6.5. CONCLUSIONES.....	159
<b>CAPÍTULO VII: CONCLUSIONES FINALES (FINAL CONCLUSIONS).....</b>	<b>161</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>167</b>
<b>ANEXO: PUBLICACIONES RELACIONADAS (RELATED PAPERS).....</b>	<b>191</b>



## **RESUMEN**



## RESUMEN

Esta memoria recoge los resultados más relevantes obtenidos en el desarrollo de metodologías analíticas avanzadas para la determinación y caracterización de organismos modificados genéticamente en matrices alimentarias. La memoria está dividida en siete capítulos.

En el primero de ellos, se lleva a cabo una breve introducción sobre la situación actual y la importancia de la caracterización y el análisis de los organismos modificados genéticamente en alimentos. Además, se describen las principales técnicas instrumentales empleadas en el análisis de organismos modificados genéticamente, y se detallan algunas aplicaciones. También se presenta el objetivo general de esta Tesis Doctoral.

En el segundo capítulo se describe el desarrollo de una metodología analítica para la detección de levaduras modificadas genéticamente en muestras de vino mediante la combinación de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple para la amplificación de ADN y su posterior análisis mediante electroforesis capilar en gel con detector de fluorescencia inducida por láser (CGE-LIF). Con el fin de evitar la inhibición de la amplificación del ADN debida a la presencia de polifenoles, taninos y otros compuestos presentes en los extractos de ADN del vino, se lleva a cabo una optimización de las condiciones de extracción de ADN a partir de vino. Posteriormente, se lleva a cabo la optimización de la PCR múltiple, empleando CGE-LIF. La elevada sensibilidad y resolución de esta técnica la convierten en una herramienta ideal para el proceso de optimización de la PCR múltiple. La metodología desarrollada se aplicó a la determinación de la cepa recombinante EKD-13 de *S. cerevisiae* en muestras de vino.

En el tercer capítulo, se lleva a cabo la comparación de dos estrategias analíticas, una basada en el análisis mediante electroforesis capilar acoplada a un espectrómetro de masas de trampa de iones (CE-IT-MS) y otra en el análisis mediante electroforesis capilar acoplada a un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo (CE-TOF-MS), para la detección de la fracción proteica de las zeínas en muestras de maíz. En concreto, se estudia cómo afecta la variación de los parámetros instrumentales de los espectrómetros

de masas a la detección de estas proteínas. Esta comparación concluye que la variación de los parámetros instrumentales afecta en mayor medida a la determinación de proteínas mediante CE-IT-MS que mediante CE-TOF-MS. Sin embargo, ambos procedimientos presentan límites de detección y reproducibilidad similares. Finalmente, las dos metodologías de análisis se aplicaron a la determinación de los perfiles de la fracción de zeínas en extractos de maíz transgénico MON810 y su correspondiente variedad convencional, sin encontrar diferencias significativas entre ambos perfiles.

En el cuarto capítulo, se estudian las características de tres nuevas ciclodextrinas como selectores quirales. Se analiza la resolución, la sensibilidad, el tiempo de migración y la eficacia, proporcionados por cada ciclodextrina en un tampón de separación. Posteriormente, se lleva a cabo el desarrollo de un método de detección de aminoácidos quirales mediante CE-TOF-MS, empleando 0.5 mM de la ciclodextrina modificada seleccionada en el tampón de separación. La baja concentración de ciclodextrina necesaria para la separación de los aminoácidos quirales permite la entrada directa del tampón de separación en la interfase de electrospray originando sólo una ligera reducción de la sensibilidad. La metodología desarrollada se empleó para el análisis de aminoácidos quirales en muestras de vinagre, soja convencional y soja modificada genéticamente. Esta metodología ha permitido determinar pequeñas variaciones entre las fracciones de aminoácidos quirales procedentes de soja transgénica Roundup Ready<sup>TM</sup> y convencional.

En el quinto capítulo, se lleva a cabo el desarrollo de un método de análisis de perfiles metabólicos en muestras de soja transgénica Roundup Ready<sup>TM</sup> y soja convencional, mediante el empleo de CE-TOF-MS. Para ello, se realiza una optimización de la extracción de metabolitos y de las condiciones de separación y análisis. La aplicación de la metodología desarrollada permitió detectar e identificar más de 40 metabolitos en muestras de soja. Asimismo, la comparación de los perfiles metabólicos entre la soja transgénica y su respectiva variedad convencional, permitió detectar diferencias significativas en la concentración de los metabolitos entre ambos organismos. En concreto, destaca el metabolito 4-hidroxi-L-treonina que se detectó en la variedad convencional de soja, y no se detectó en la variedad transgénica.

El sexto capítulo se presenta dividido en dos secciones. La primera sección aborda el desarrollo de un procedimiento analítico en CE-TOF-MS para la obtención y comparación de perfiles metabólicos en tres variedades de maíz transgénico y sus correspondientes variedades convencionales. Esta metodología permitió detectar más de 25 metabolitos en cada una de las variedades de maíz. Además, la comparación de los perfiles metabólicos permitió detectar diferencias estadísticamente significativas entre las variedades transgénicas y sus correspondientes variedades convencionales. En concreto, se ha demostrado que los metabolitos L-carnitina y estaquidrina, se encuentran en concentraciones más elevadas en las tres variedades transgénicas investigadas que en sus respectivas variedades convencionales. La segunda sección se basa en un estudio pormenorizado de la composición de metabolitos en extractos de maíz transgénico y convencional, mediante la combinación de técnicas de espectrometría de masas, con técnicas de separación y técnicas de extracción. En esta sección se demuestra que la combinación de la información de la movilidad electroforética de los compuestos junto con la gran exactitud de la masa molecular proporcionada por un espectrómetro de masas de resonancia ion ciclotrón con transformada de Fourier (FT-ICR-MS) es una estrategia apropiada para la identificación de metabolitos. Además, se demuestra que el empleo de técnicas de extracción selectiva (como la extracción con líquidos presurizados, PLE) permite obtener información útil para la identificación de metabolitos. Finalmente, mediante el empleo de estas técnicas se obtuvieron diferencias en los perfiles metabólicos entre las variedades transgénicas de maíz y sus correspondientes variedades convencionales, sobre todo en algunas rutas relacionadas con el metabolismo de los aminoácidos.

En el séptimo y último capítulo se recogen las conclusiones finales de los trabajos realizados. En el anexo se presentan las publicaciones a las que esta Tesis Doctoral ha dado lugar.



## **ENGLISH SUMMARY**





## ENGLISH SUMMARY

In this work, several analytical methodologies based on CE-LIF and CE-MS have been developed to detect genetically modified organisms (GMO) in food samples, and characterize their metabolic and protein profiles. This PhD Thesis is divided in 8 chapters.

In Chapter I, a general introduction on the importance of detecting GMOs together with the analytical techniques used to achieve this goal is provided. Furthermore, some applications of a wide variety of analytical methodologies for the characterization of GMOs are also provided. The general goal of this PhD Thesis is then presented in section 1.9. **This goal is the development of advanced analytical methodologies to detect and characterize GMOs in foods, including the investigation of possible unintended modifications induced by the genetic modification at proteomic and metabolomic level.**

In Chapter II, a novel methodology based on the combined use of multiplex PCR and capillary gel electrophoresis with laser induced fluorescence detection (CGE-LIF) is developed for the fast and sensitive detection of genetically modified yeasts in wine. As model, a recombinant EKD-13 *S. cerevisiae* strain was selected and different wines were produced using either the recombinant or a conventional yeast. Special emphasis is put on the yeast DNA extraction from wine, investigating different extraction conditions to obtain amplifiable DNA. To unequivocally detect the transgenic yeast, two specific segments of the transgenic construction were amplified. In addition, a third primer pair was used as amplification control to confirm the quality of the yeast DNA obtained from the extraction step. CGE-LIF provided high sensitivity, good analysis speed and impressive resolution of DNA fragments, making this technique very convenient to optimize multiplex PCR parameters and to analyze the amplified DNA fragments. The method developed in this work allowed the sensitive detection of transgenic yeasts in wine samples in less than one working day.

In Chapter III, two different CE-MS instruments, namely, capillary electrophoresis-electrospray-ion trap mass spectrometry (CE-ESI-IT-MS) and capillary electrophoresis-

electrospray-time of flight mass spectrometry (CE-ESI-TOF-MS), applied to analyze intact proteins from complex samples are investigated. Thus, the effect of different MS instrumental settings (i.e. capillary exit offset, skimmer I voltage, octopole voltage and trap voltage in CE-ESI-IT-MS or transfer time, hexapole Rf voltage and prepulse storage in CE-ESI-TOF-MS), protein concentrations and type of samples on the MS spectra of zein proteins previously separated by CE are examined. Results show that although CE-ESI-IT-MS provides cleaner MS spectra of intact proteins, CE-ESI-TOF-MS allows the identification of a higher number of proteins from complex matrices in an easier way. Performance in terms of peak area reproducibility (RSD equal to 11%) and LOD (values from 1-5 ppm) were similar for both instruments. The usefulness of the optimized CE-ESI-IT-MS and CE-ESI-TOF-MS conditions was demonstrated by studying the zein-proteins composition of three conventional maize lines and their corresponding transgenic lines, showing not significant differences.

In Chapter IV, three modified cyclodextrins (mCDs, namely, 6-deoxy-6-[1-(2-amino) - ethylamino]- $\beta$ -CD, 6-deoxy-6-[N-(2-methylamino)-pyridine]- $\beta$ -CD and 3-monodeoxy-3-monoamino- $\beta$ -CD) are investigated as chiral selectors for CE-LIF and CE-ESI-TOF-MS. The potential of these three mCDs as chiral selectors in CE was also compared with the unmodified  $\beta$ -CD and  $\gamma$ -CD. A group of ten different D- and L-amino acids derivatized with fluorescein isothiocyanate (FITC) was selected as case-study for CE-LIF and CE-MS comparison. The analytes group includes negatively (D/L-Glu and D/L-Asp), neutral (D/L-Ala and D/L-Asn) and positively (D/L-Arg) charged amino acids. Chiral separation conditions compatible with CE-ESI-TOF-MS could be achieved based on the figures of merit obtained by CE-LIF using the different CDs. Interestingly, LODs values obtained by chiral CE-ESI-TOF-MS were in the nM range, comparable or only slightly worse to those obtained by CE-LIF. Moreover, the time of analysis using mCDs was reduced more than 30% compared to the non-chiral conditions (19.2 min vs. 28.4 min, respectively), with resolution and efficiency values as high as 5.15 and 843000 plates/m, respectively. The usefulness of this chiral CE-ESI-TOF-MS method was corroborated through the detection of the main D- and L-amino acids found in different real samples including transgenic vs. conventional soy and vinegar. Slight changes in transgenic soybean aminoacid composition were found in contrast with its conventional counterpart using this methodology.

In Chapter V, CE-ESI-TOF-MS is proposed to identify and quantify the main metabolites found in transgenic soybean and its corresponding non-transgenic parental line both grown under identical conditions. The procedure includes optimization of metabolites extraction, separation by CE, on-line electrospray-TOF-MS analysis and data evaluation. Eleven extraction buffers and several background electrolytes and separation conditions are tested in order to obtain a highly reproducible and sensitive analytical methodology. Using this approach, more than 40 metabolites were tentatively identified based on the high mass accuracy provided by the TOF-MS analyzer, together with the isotopic pattern and expected electrophoretic mobility of these compounds. In general, the same metabolites at similar concentration levels were found in the conventional and transgenic variety. However, significant differences were also observed in some specific cases when the conventional variety was compared with its corresponding transgenic line. For instance, 4-hydroxy-L-threonine was detected in conventional soybean and not detected in transgenic soybean. The selection of these metabolites as possible biomarkers of transgenic soybean is discussed, although a larger number of samples need to be analyzed in order to validate this point. It is concluded that metabolomic procedures based on CE-MS can open new perspectives in the study of transgenic foods in order to corroborate (or not) the equivalence with their conventional counterparts.

Chapter VI is divided in two parts. In the first part, a new methodology based in CE-ESI-TOF-MS is proposed to identify and quantify the main metabolites in six different varieties of maize, three of them transgenic (PR33P67, Tietar Bt and Aristis Bt) and their corresponding isogenic lines (PR33P66, Tietar and Aristis) grown under the same field conditions. The shotgun-like approach for metabolomics developed in this part of the Chapter includes optimization of metabolites extraction from GM and non-GM maize, separation by CE, on-line electrospray-TOF-MS analysis and data evaluation. Several extraction procedures and background electrolytes are tested in order to obtain a highly reproducible and informative metabolomic profile. Using this approach, more than 25 metabolites were tentatively identified in each sample. Significant differences were systematically observed between the detected amounts of some metabolites in conventional varieties compared with their corresponding transgenic lines. Results pointed to stachydrine and L-carnitine metabolites as possible biomarkers of transgenic Bt maize. A principal component analysis (PCA) confirmed this result, although a

larger number of samples need to be analyzed in order to validate this point. In the second part of Chapter VI, the potential of combining CE-ESI-TOF-MS and Fourier transform-ion cyclotron resonance-mass spectrometry (FT-ICR-MS) for metabolomics of GMOs is demonstrated. Thus, the same maize samples as in the first part were analyzed. Based on the ultrahigh resolution and remarkable mass accuracy provided by the 12-Tesla FT-ICR-MS it was possible to directly analyze a good number of metabolites whose identity could be proposed based on their specific isotopic pattern. For unambiguous identification of metabolite isomers CE-ESI-TOF-MS was complementarily used combining the information on nominal mass with electrophoretic mobility corroborating in that way the identity of several biomarkers. Furthermore, PLE extractions were evaluated in order to establish selective extraction as an additional criterion to obtain useful information in maize metabolomics. Differences in the metabolite levels were found between the three transgenic maize varieties compared with their wild isogenic lines in some specific metabolic pathways, especially those related to aminoacid metabolism.

In Chapter VII, the main conclusions that can be extracted from this work are summarized. Finally, the Appendix section presents the publications originated by this PhD Thesis.

## **LISTA DE ABREVIATURAS**



## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>2-DGE</b>	Electroforesis bidimensional en gel
<b>aa</b>	Aminoácido
<b>A<sub>conv</sub></b>	Área del pico en la muestra convencional
<b>A<sub>OMG</sub></b>	Área del pico en la muestra transgénica
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>AGE</b>	Electroforesis convencional en gel de agarosa
<b>APCI</b>	Ionización química a presión atmosférica
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>BPE</b>	Electroferograma de pico base
<b>CaMV</b>	Virus del mosaico de la coliflor
<b><math>\alpha</math>-CD</b>	$\alpha$ -ciclodextrina
<b><math>\beta</math>-CD</b>	$\beta$ -ciclodextrina
<b><math>\gamma</math>-CD</b>	$\gamma$ -ciclodextrina
<b>CD</b>	Ciclodextrina
<b>CD3NH2</b>	3-monodeoxi-3-monoamino- $\beta$ -ciclodextrina
<b>CDampy</b>	6-deoxi-6-[N-(2-metilamino)-piridina]- $\beta$ -ciclodextrina
<b>CDen</b>	6-deoxi-6-[1-(2-amino)-etilamino]- $\beta$ -ciclodextrina
<b>CE</b>	Electroforesis capilar
<b>CE-ESI-IT-MS</b>	Acoplamiento electroforesis capilar-electrospray-trampa de iones-espectrometría de masas
<b>CE-ESI-TOF-MS</b>	Acoplamiento electroforesis capilar-electrospray-tiempo de vuelo-espectrometría de masas
<b>CE-LIF</b>	Electroforesis capilar con detector de fluorescencia inducida por láser
<b>CE-MS</b>	Electroforesis capilar-espectrometría de masas
<b>CE-UV</b>	Electroforesis capilar con detección ultravioleta
<b>CFG</b>	Cromatografía de filtración en gel
<b>CGE</b>	Electroforesis capilar en gel
<b>CGE-LIF</b>	Electroforesis capilar en gel con detector de fluorescencia inducida por láser
<b>CV</b>	Coefficiente de variación.
<b>Da</b>	Dalton
<b>D.I.</b>	Diámetro interno
<b>DIGE</b>	Electroforesis diferencial en gel
<b>DO<sub>260/280</sub></b>	Relación de la densidad óptica a 260 nm/280 nm
<b>DO<sub>260/230</sub></b>	Relación de la densidad óptica a 260nm/230 nm
<b>dATP</b>	2'-deoxiadenosina-5'-trifosfato
<b>dCTP</b>	2'-deoxicitidina-5'-trifosfato
<b>dGTP</b>	2'-deoxiguanosina-5'-trifosfato
<b>dUTP</b>	2'-deoxiuridina-5'-trifosfato
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>EFSA</b>	European Food Safety Agency
<b>EIE</b>	Electroferograma de iones extraídos
<b>ELISA</b>	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas
<b>EMBL</b>	European Molecular Biology Laboratory
<b>EPSPS</b>	5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa
<b>EpyM-DMA</b>	2-etil-(2-pirrolidina) metacrilato-N, N-dimetilacrilamida

<b>ESI</b>	Ionización por electrospray
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration (EEUU)
<b>FITC</b>	Isotiocianato de fluoresceína
<b>FT-ICR-MS</b>	Espectrometría de masas de resonancia ion-ciclotrón con transformada de Fourier
<b>GABA</b>	Ácido $\gamma$ -aminobutírico
<b>GC</b>	Cromatografía de gases
<b>GC-MS</b>	Cromatografía de gases-espectrometría de masas
<b>GMF</b>	Herramienta “Generate Molecular Formula” del software DataAnalysis 3.3 (Bruker)
<b>GOA</b>	Base de datos “Gene Ontology Annotation”
<b>GOLD</b>	Base de datos “Genomes online”
<b>HEC</b>	2-hidroxietil celulosa
<b>HMDB</b>	Base de datos “Human Metabolome Database”
<b>HPLC</b>	Cromatografía de líquidos de alta eficacia
<b>IAA</b>	Ácido indol-3-acético
<b>ICP</b>	Plasma de acoplamiento inductivo
<b>ISAAA</b>	Servicio Internacional para la Adquisición de Aplicaciones Agrobiotecnológicas
<b>IT</b>	Trampa de iones
<b>KEGG</b>	Base de datos “Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes”
<b>LC</b>	Cromatografía de líquidos
<b>LC-MS</b>	Cromatografía de líquidos-espectrometría de masas
<b>LIF</b>	Fluorescencia inducida por láser
<b>LOD</b>	Límite de detección
<b>MALDI</b>	Ionización y desorción por láser asistida por una matriz
<b>mCDs</b>	Ciclodextrinas modificadas
<b>MLGA</b>	Amplificación múltiple del genoma dependiente de la ligasa
<b>MLPA</b>	Amplificación múltiple de sondas dependiente de la ligasa
<b>MMG</b>	Microorganismo modificado genéticamente
<b>M<sub>r</sub></b>	Masa molecular relativa
<b>MS</b>	Espectrometría de masas
<b>N</b>	Eficacia
<b>NCBI</b>	National Center for Biotechnology Information (EEUU)
<b>NIH</b>	National Institute of Health (EEUU)
<b>nLC-ESI-QTOF</b>	Nano-LC-electrospray-espectrómetro de masas de cuadrupolo-tiempo de vuelo
<b>OMG</b>	Organismo modificado genéticamente
<b>PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PCA</b>	Análisis de componentes principales
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PFP</b>	p-fluorofenilalanina
<b>PFT</b>	Llenado parcial del capilar
<b>PLE</b>	Extracción con líquidos presurizados
<b>PLS-DA</b>	Análisis discriminante sobre la regresión por mínimos cuadrados parciales
<b>PM</b>	Peso molecular
<b>ppm</b>	Partes por millón
<b>psi</b>	Libras por pulgada cuadrada



<b>PTM</b>	Modificaciones postraduccionales
<b>PTS</b>	Fosfotransferasa
<b>PVPP</b>	Polivinilpolipirrolidona
<b>Q</b>	Cuadrupolo
<b>QqQ</b>	Triple cuadrupolo
<b>R</b>	Resolución
<b>Rf</b>	Radiofrecuencia
<b>RMN</b>	Resonancia magnética nuclear
<b>RP-HPLC</b>	Cromatografía de líquidos de alta eficacia en fase reversa
<b>RR</b>	Roundup Ready <sup>TM</sup>
<b>RSD</b>	Desviación estándar relativa
<b>SD</b>	Desviación estándar
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato sódico
<b>SFE</b>	Extracción con fluidos supercríticos
<b>SIMCA</b>	Modelado suave independiente de analogía de clases
<b>Skim1</b>	Skimer 1
<b>TCA</b>	Ácido tricloroacético
<b>TEA</b>	Trietilamina
<b>TIE</b>	Electroferograma de iones totales
<b>t<sub>exp</sub></b>	t de Student experimental
<b>T<sub>m</sub></b>	Temperatura de desnaturalización
<b>t<sub>m</sub></b>	Tiempo de migración
<b>TOF</b>	Tiempo de vuelo
<b>Tris</b>	Tris (hidroximetil) aminometano
<b>UDG</b>	Uracil ADN-glicosilasa
<b>UE</b>	Unión Europea
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>YPD</b>	Medio rico de levaduras “Yeast, peptone, dextrose”

NOTA: En la mayoría de los casos se ha escogido la variante anglosajona de las abreviaturas debido a su empleo generalizado.



## **CAPÍTULO I: Introducción y objetivo**



## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Alimentos transgénicos

El término alimentos transgénicos o alimentos modificados genéticamente engloba a todos los alimentos o ingredientes alimentarios que contienen, están compuestos o han sido producidos a partir de organismos modificados genéticamente (OMGs). Según la Normativa Europea, un OMG se define como “el organismo, con excepción de los seres humanos, cuyo material genético ha sido modificado de una manera que no se produce naturalmente en el apareamiento ni en la recombinación natural” ([Directiva 2001/18/CE del Parlamento Europeo](#)).

### 1.2 Tecnología del ADN recombinante

El desarrollo de OMGs se realiza mediante el empleo de técnicas de ingeniería genética, también llamadas técnicas del ADN recombinante. Dichas técnicas brindan una metodología apropiada para aislar un gen de un organismo, para su posterior manipulación e inserción en otro organismo, que puede ser de la misma especie o no ([Jackson y col., 1972](#); [Lobban y col., 1973](#); [Cohen y col., 1973](#)). Una de las ventajas más interesantes de la tecnología del ADN recombinante, respecto a las técnicas clásicas de mejora vegetal (cruzamientos, mutagénesis, etc.) es que permite realizar la modificación genética de manera dirigida.

El fragmento de ADN introducido en el genoma del nuevo organismo se denomina inserto. El inserto está generalmente formado por tres elementos: promotor, región codificante y terminador. El promotor es una secuencia de ADN situada en el extremo 5' cuya función es regular la transcripción del gen insertado. La región codificante es la secuencia genética que se transcribe para sintetizar la proteína transgénica. Finalmente, el terminador determina el punto final de la transcripción ([Robinson, 2002](#)). En plantas transgénicas el promotor más empleado es el P-35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) y el terminador *nos* del gen nopalina sintasa de *Agrobacterium tumefaciens*. El OMG resultante de la integración estable de la construcción transgénica en el genoma se conoce como “evento” de transformación. En algunos casos se persigue la integración

de más de una construcción transgénica en el mismo organismo (lo que se denomina “gene stacking”) con el objetivo de desarrollar OMGs con más de una característica, como por ejemplo plantas con resistencia a plagas y tolerancia a herbicidas. Los OMGs que presentan estas construcciones se denominan eventos apilados.

Se pueden emplear varias técnicas para la modificación del genoma de un organismo. Por ejemplo, en el caso de plantas, se puede emplear una bacteria (normalmente *A. tumefaciens*) que porta un vector con la secuencia que se quiere integrar (Figura 1.1), o bien mediante técnicas de microencapsulación, microinyección, fusión de células o protoplastos (Kok y col., 2003). En el caso de microorganismos, existen otros métodos que facilitan la introducción del ADN exógeno de la célula, como por ejemplo el empleo de cationes metálicos (por ejemplo  $\text{Li}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cs}^+$ ) (Ito y col., 1983).

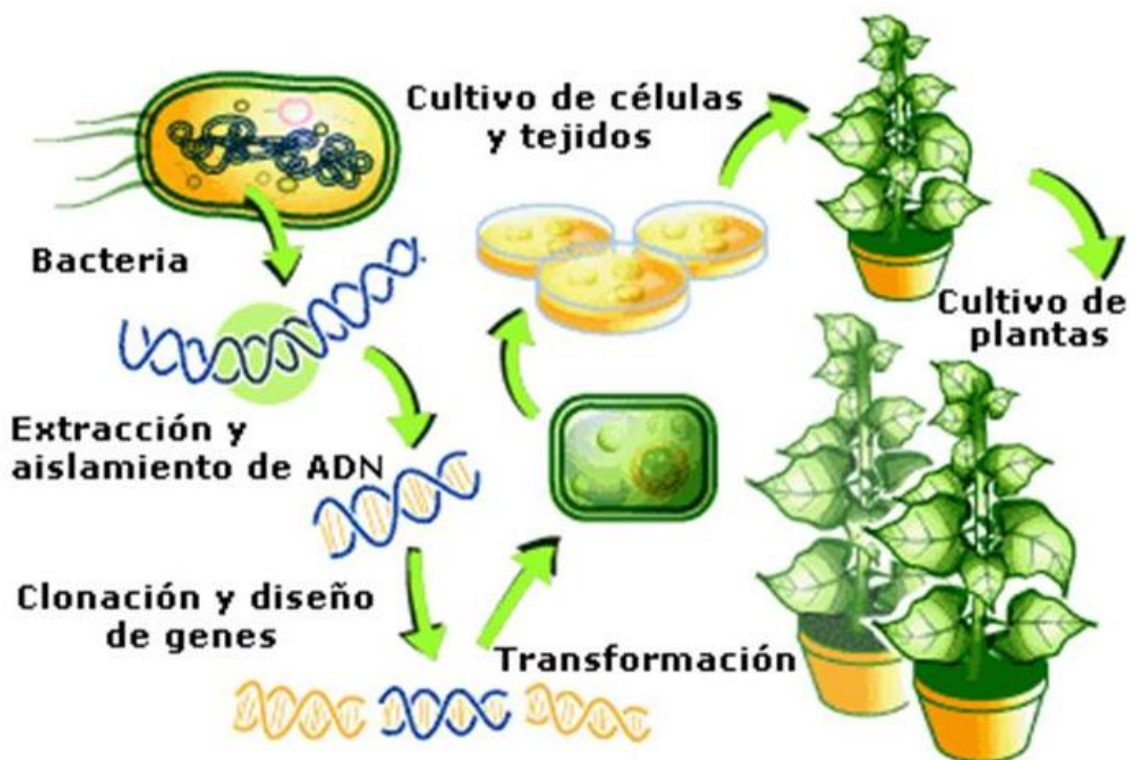


Figura 1.1. Esquema de la transformación de un cultivo transgénico.

### 1.3 Características de los alimentos transgénicos

El objetivo de la modificación genética es introducir una nueva característica en un determinado organismo. En la industria agroalimentaria estas características permiten mejorar el rendimiento durante la producción agraria, obtener algún beneficio tecnológico durante el procesado o el almacenamiento del alimento, o bien mejorar alguna propiedad nutritiva u organoléptica.

La característica más común que presentan los cultivos transgénicos en la actualidad es la resistencia a plagas, seguida de la tolerancia a herbicidas (De Block y col., 1987; Hails, 2000; James, 2009). Los cultivos transgénicos que presentan estas características han sido los primeros en comercializarse, y se les conoce como alimentos transgénicos de primera generación.

La tolerancia a herbicidas proporciona un aumento en la producción agraria y disminuye el uso de herbicidas perjudiciales para el medio ambiente. La variedad transgénica de soja (*Glycine max*) Roundup Ready<sup>TM</sup> (RRS, evento MON40-30-2) es la que ha alcanzado mayor difusión en el mercado a nivel mundial. El cultivo de RRS tolera el herbicida glifosato gracias a la inserción del gen EPSPS de la cepa CP4 de la bacteria *A. tumefaciens*, que codifica para una versión del enzima que es resistente a la acción de dicho herbicida (Padgett y col., 1995). Además de la soja RR también se han desarrollado otros cultivos con tolerancia a herbicidas, como por ejemplo el maíz (*Zea mays*) GA21, el trigo (*Triticum aestivum*) MON71800 o el algodón (*Gossypium herbaceum*) GHB614.

Por otro lado, los OMGs con resistencia a plagas han ganado importancia en los últimos años, particularmente el maíz. La mayor parte de estos cultivos contienen genes insertados que confieren resistencia a determinados lepidópteros, como por ejemplo el denominado “taladro” (*Ostrinia nubilalis*). Dichos transgenes, que provienen de la bacteria del suelo *Bacillus thuringiensis*, codifican para proteínas insecticidas (toxinas Bt) cuya acción afecta principalmente a las larvas de algunos lepidópteros (Koziel y col., 1993). Existen otros cultivos resistentes a plagas como por ejemplo el tomate (*Lycopersicum esculentum*) o el arroz (*Oriza sativa*) (Hayakawa y col., 1992; Jongedijk

y col., 1992). Incluso se han desarrollado cultivos con propiedades antifúngicas, por ejemplo una variedad de patata (*Solanum tuberosum*) que tiene insertado un gen de alfalfa (*Medicago sativa*) que le confiere resistencia al patógeno *Verticillium dahliae* (Gao y col., 2000), o propiedades antibacterianas, como una variedad de tomate que expresa el gen *Bs2* de pimienta (*Piper nigrum*), que le confiere resistencia a la bacteria *Xanthomonas campestris* (Tai y col., 1999).

Otras características que presentan los cultivos transgénicos son la resistencia a condiciones de estrés, como por ejemplo a la sequía (Gisbert y col., 2000), o las modificaciones que facilitan algún proceso tecnológico. Es el caso de la variedad de patata Amflora (evento EH92-527-1, BASF, Alemania), cuyo cultivo ha sido recientemente aprobado en la Unión Europea (UE). Esta patata presenta una modificación genética que inhibe la síntesis de  $\alpha$ - y  $\beta$ -amilasas (Kuipers y col., 1995), y por tanto su almidón es rico en amilopectina, lo que confiere una viscosidad y textura que son más adecuadas para determinadas aplicaciones industriales, como la producción de papel o pegamento.

Actualmente, se está desarrollando una segunda generación de OMGs cuyo objetivo es mejorar determinadas propiedades nutricionales de los alimentos. Las modificaciones genéticas en estos nuevos organismos afectan a una o más rutas metabólicas con el propósito de aumentar, en los cultivos, el contenido en vitaminas, antioxidantes u otros compuestos con un beneficio funcional (Kok y col., 2008). Un ejemplo representativo de estos OMGs de segunda generación es el denominado “arroz dorado”, una variedad de arroz que contiene insertados varios genes de narciso (*Narcissus pseudonarcissus*) y de una bacteria (*Erwinia uredovora*) que participan en la síntesis de carotenoides y que permiten mejorar la producción de provitamina A en el endospermo del arroz (Ye y col., 2000; Potrykus, 2001). Entre otros ejemplos de OMGs de segunda generación, se encuentra una variedad de tomate cuyo contenido en ácido fólico es 25 veces superior al de las variedades no transgénicas (De la Garza y col., 2007), o una variedad de maíz con mayor concentración de  $\beta$ -caroteno, vitamina C y vitamina B9 que su correspondiente variedad convencional (Naqvi y col., 2009).



## 1.4 Situación actual de los alimentos transgénicos

En 1994, la Food and Drug Administration (FDA) aprobó la comercialización en Estados Unidos del primer alimento transgénico, el tomate Flavr Savr<sup>TM</sup>. Desde entonces se han aprobado alrededor de 150 OMGs en diferentes países (CERA Crop Database, 2010 en <http://www.agbios.com>). En estos 15 años, la superficie dedicada a producción de cultivos transgénicos se ha multiplicado por 80. Este incremento convierte el desarrollo de cultivos transgénicos en la tecnología agraria con mayor aceptación entre los agricultores en la historia reciente de la agricultura (James, 2009). En concreto, en 2009 se plantaron 134 millones de hectáreas de cultivos transgénicos repartidas en 25 países, lo que supuso un incremento del 7% con respecto al año anterior. En la Figura 1.2 se muestra el mapa de la situación mundial de los cultivos transgénicos.



Figura 1.2. Producción a nivel mundial de los cultivos transgénicos (James, 2009).

En el momento actual, se cultivan 155 variedades transgénicas de 24 especies de plantas, de las cuales las cuatro principales son soja, algodón, maíz y colza (*Brassica napus*) (James, 2009). En la Tabla 1.1 se recogen los datos de los cultivos transgénicos a nivel mundial. Se estima que en 2009 se ha dedicado al cultivo transgénico más del 75% de la superficie de soja, casi la mitad de la superficie de algodón y más del 25% de

maíz. De los 25 países que han autorizado el cultivo de alimentos transgénicos, 17 son países subdesarrollados o en vías de desarrollo, lo que indica que estos cultivos están teniendo una mayor acogida en los países en vías de desarrollo que en los países desarrollados.

En la Unión Europea, únicamente seis países cultivan maíz transgénico actualmente (España, República Checa, Portugal, Rumanía, Polonia y Eslovaquia). España es el mayor productor comunitario y el decimocuarto del mundo, con el 80 % de la superficie total de cultivos de maíz resistentes a insectos de la Unión Europea (James, 2009).

Tabla 1.1. Países en los que se cultivan plantas transgénicas (James y col., 2009).

Puesto	País	Cultivo biotecnológico
1	EEUU	Soja, maíz, algodón, colza, calabaza, papaya, alfalfa, y remolacha azucarera
2	Brasil	Soja, maíz y algodón
3	Argentina	Soja, maíz y algodón
4	India	Algodón
5	Canadá	Colza, maíz, soja y remolacha azucarera
6	China	Algodón, tomate, álamo, papaya y pimiento dulce
7	Paraguay	Soja
8	Sudáfrica	Maíz, soja y algodón
9	Uruguay	Soja y maíz
10	Bolivia	Soja
11	Filipinas	Maíz
12	Australia	Algodón y colza
13	Burkina Faso	Algodón
14	España	Maíz
15	México	Algodón y soja
16	Chile	Maíz, soja y colza
17	Colombia	Algodón
18	Honduras	Maíz
19	República Checa	Maíz
20	Portugal	Maíz
21	Rumanía	Maíz
22	Polonia	Maíz
23	Costa Rica	Algodón y soja
24	Egipto	Maíz
25	Eslovaquia	Maíz

## 1.5 Aspectos controvertidos de los OMGs

Aunque los cultivos transgénicos llevan comercializándose durante más de una década, los consumidores y diversas organizaciones no gubernamentales han manifestado sus dudas acerca de los riesgos que pueden presentar estos nuevos organismos tanto para la salud humana y animal, como para el medio ambiente. Los aspectos que suscitan más controversia se refieren a los riesgos medioambientales (Hails, 2000; Wolfenbarger y col., 2000; Thomson, 2003) y a los riesgos relacionados con la salud humana y animal (Garza y col., 2003; Domingo, 2007; Craig y col., 2008), aunque también existen una serie de consideraciones éticas (Frewer y col., 2004) y factores socio-económicos (Herring, 2008; Vergragt y col., 2008).

La liberación de OMGs al medio ambiente conlleva una serie de riesgos que deben considerarse. En ocasiones, estos riesgos se basan en que, tanto la introducción de un nuevo organismo en un ecosistema, como la eliminación de otro ya existente, provocan un desequilibrio en dicho ecosistema. Este desequilibrio puede afectar, de manera directa o indirecta, a todos los organismos relacionados con el ecosistema. Por ejemplo, se ha demostrado el incremento de la mortalidad en las larvas de la mariposa Monarca (*Danaus plexippus*) que ingieren el polen de maíz transgénico (Losey y col., 1999). También se ha registrado una disminución de la población del coleóptero *Lebia grandis* en los cultivos de una patata transgénica resistente a la plaga del escarabajo de la patata, respecto a su población en cultivos no transgénicos, debida a que dicho escarabajo forma parte de la dieta de *Lebia grandis* (Riddick y col., 1998).

Algunos estudios sugieren que la modificación genética, además de generar el producto esperado, podría dar lugar a otras alteraciones, no esperadas, en el OMG (National Research Council of the National Academies, 2004). Las modificaciones inesperadas son aquellas que se producen en el OMG, pero que no son el objetivo de la modificación genética. A pesar de que la transformación de OMGs es un proceso dirigido, no se conocen totalmente los mecanismos moleculares que ocurren durante la inserción. Durante el proceso de inserción del gen, es frecuente la aparición de mutaciones, tanto en la secuencia transgénica, como en otros lugares del genoma. Las mutaciones pueden ser deleciones, inserciones, duplicaciones, o la inserción de más de

una copia del gen (Latham y col., 2006). En ocasiones, la secuencia insertada carece de estabilidad, lo que puede ocasionar también deleciones, inserciones o translocaciones de secuencias genéticas de tamaño muy variado (Cellini y col., 2004). Todas estas alteraciones en el genoma del nuevo organismo pueden ocasionar variaciones tanto en los niveles de expresión génica, como en la secuencia transcrita de ARN mensajero. Algunas de estas alteraciones podrían pasar desapercibidas si no se emplean técnicas de análisis apropiadas. La detección de las modificaciones inesperadas se lleva a cabo mediante el estudio de diferencias estadísticamente significativas entre el fenotipo del OMG y el fenotipo del correspondiente organismo no transgénico (Cellini y col., 2004). Una vez detectadas, algunas modificaciones inesperadas se pueden explicar a partir del conocimiento del metabolismo y de la interconexión entre las rutas metabólicas del organismo en estudio (Kuiper y col., 2001; Ali y col., 2008).

Los OMGs de segunda generación pueden presentar una mayor susceptibilidad a la aparición de modificaciones inesperadas debido a que las modificaciones genéticas afectan a varias rutas metabólicas (Flachowsky y col., 2005). También es posible que en los organismos que contienen más de un inserto aumente la probabilidad de aparición de modificaciones inesperadas (König y col., 2004). Estas modificaciones inesperadas generan incertidumbre acerca de la seguridad de los alimentos transgénicos (Ioset y col., 2007).

## **1.6 Normativa sobre OMGs**

La controversia acerca de los OMGs ha dado lugar, tras varios años de continuas discrepancias en la Unión Europea, a la elaboración de una Normativa específica para el desarrollo, liberación al ambiente, comercialización y etiquetado de los alimentos y piensos que contienen OMGs. El objetivo de esta Normativa es establecer procedimientos comunitarios para la autorización y supervisión de los OMGs, así como dar al consumidor la información que demanda, a través del etiquetado de los productos. El nuevo Reglamento (Regulación (EC) 1829/2003 y Regulación (EC) 1830/2003 del Parlamento Europeo) establece que el etiquetado distintivo de estos productos es un requisito imprescindible para permitir su comercialización, salvo para aquellos productos en los que los OMGs aparezcan a niveles inferiores o iguales al 0.9% a nivel

de ingrediente, y como resultado de una contaminación técnicamente inevitable durante el proceso de producción. En alimentos que están en proceso de aprobación, este límite es del 0.5%, siempre que hayan superado la fase de evaluación de riesgos de manera favorable. Además, la legislación impone el empleo de sistemas de trazabilidad que permitan llevar a cabo el seguimiento de cualquier OMG a lo largo de su producción y procesado. La trazabilidad permite una actuación más efectiva por parte de las autoridades sanitarias en caso de presentarse algún problema de salud pública relacionado con el consumo de OMGs. En consecuencia, en los últimos años, se ha trabajado activamente en el desarrollo de nuevos procedimientos analíticos para la detección de OMGs en alimentos con el fin de verificar el cumplimiento de la Normativa Europea en vigor.

La Directiva 2001/18/CE del Parlamento Europeo regula la liberación al medio ambiente y comercialización de OMGs en la UE. Esta Directiva establece que la comercialización de OMGs sólo debe autorizarse tras haberse llevado a cabo una evaluación científica de cualquier riesgo que presenten los OMGs para la salud humana y animal, así como para el medio ambiente. La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) es la responsable de realizar esta evaluación de riesgos y emitir un informe para la aprobación del OMG en la Comisión Europea. Los microorganismos modificados genéticamente (MMGs) destinados a la comercialización o liberación al medio ambiente están sujetos a la misma Directiva 2001/18/CE, mientras que la utilización confinada de MMGs está regulada por la 2009/41/CE (**Directiva 2009/41/CE del Parlamento Europeo**).

Actualmente, la Unión Europea autoriza el cultivo de dos variedades de maíz (MON810, T25) y una variedad de patata (EH92-527-1). Además, la Unión Europea ha autorizado también la comercialización, pero no el cultivo, de algunas variedades de algodón, soja, maíz, colza y remolacha azucarera. Las variedades de cultivos transgénicos aprobados por la Unión Europea para su comercialización se recogen en la Tabla 1.2.

**Tabla 1.2.** Variedades de cultivos transgénicos aprobados para su comercialización por la Unión Europea ([http://ec.europa.eu/food/dyna/gm\\_register/index\\_en.cfm](http://ec.europa.eu/food/dyna/gm_register/index_en.cfm)).

Cultivo	Evento	Característica
Algodón	LL Cotton25	Tolerancia a herbicidas
	MON1445	Tolerancia a herbicidas
	MON531	Resistencia a plagas
	MON15985	Resistencia a plagas
	MON531xMON1445	Tolerancia a herbicidas + Resistencia a plagas
	MON15985xMON1445	Tolerancia a herbicidas + Resistencia a plagas
Maíz	Bt11	Resistencia a plagas
	MON863	Resistencia a plagas
	MIR604	Resistencia a plagas
	MON88017	Tolerancia a herbicidas + Resistencia a plagas
	MON89034	Resistencia a plagas
	MON810	Resistencia a plagas
	T25	Tolerancia a herbicidas
	GA21	Tolerancia a herbicidas
	DAS59122	Tolerancia a herbicidas + Resistencia a plagas
	DAS1507	Tolerancia a herbicidas + Resistencia a plagas
	NK603	Tolerancia a herbicidas
	MON863xMON810	Resistencia a plagas
	MON863xNK603	Tolerancia a herbicidas + Resistencia a plagas
	DAS59122xNK603	Tolerancia a herbicidas + Resistencia a plagas
	DAS1507xNK603	Tolerancia a herbicidas + Resistencia a plagas
	NK603xMON810	Tolerancia a herbicidas + Resistencia a plagas
	MON863xMON810xNK603	Tolerancia a herbicidas + Resistencia a plagas
Patata	EH92-527-1	Alteración de composición
	T45	Tolerancia a herbicidas
Colza	GT 73	Tolerancia a herbicidas
	MS8xRF3	Tolerancia a herbicidas + Esterilidad masculina
Soja	MON89788	Tolerancia a herbicidas
	A2704-12	Tolerancia a herbicidas
	MON40-3-2	Tolerancia a herbicidas
Remolacha azucarera	H7-1	Tolerancia a herbicida

La “equivalencia sustancial” es un concepto clave en el proceso de evaluación de la seguridad de los OMGs. Según el Reglamento CE/258/97 sobre nuevos alimentos e ingredientes alimentarios (**Regulación (CE) 258/97 del Parlamento Europeo**), un alimento o ingrediente alimentario es sustancialmente equivalente a otro cuando no hay diferencias entre ellos en lo que se refiere a su composición, su valor nutritivo, su metabolismo, el uso al que están destinados y su contenido de sustancias indeseables, teniendo en cuenta los límites aceptados de la variabilidad natural. El Reglamento establece que, en el caso de que un alimento sea equivalente a otro ya aceptado, no se considera nuevo y no necesita un análisis de riesgos para su comercialización. Sin

embargo, en el caso de que no se de esta equivalencia, como en los OMGs, debe considerarse como un nuevo alimento y realizarse una evaluación de riesgos antes de su aprobación. Por tanto, cada OMG se debe considerar como un nuevo alimento y evaluarse caso por caso. Para la aprobación de los OMGs debe realizarse una evaluación inicial de su equivalencia sustancial respecto a la variedad no transgénica. Aunque esta evaluación inicial no constituye en sí misma una evaluación de la seguridad del OMG, es la base para llevar a cabo el análisis de riesgos (König y col., 2004). Dicha evaluación se realiza mediante la comparación de las variedades transgénicas con sus correspondientes variedades no transgénicas, asumiendo que estas últimas, debido a su uso tradicional, pueden considerarse como seguras (Kok y col., 2003). Para una adecuada comparación ambas variedades deben haber sido cultivadas en las mismas condiciones, evitando así diferencias producidas por factores bióticos y abióticos.

La EFSA ha publicado una serie de recomendaciones para efectuar el análisis de riesgos de los OMGs, en la que también recomienda las metodologías y principios que deben seguirse para la evaluación de la seguridad de estos organismos transgénicos antes de su comercialización (EFSA, 2006). En ella, se señala la necesidad de desarrollar técnicas “ómicas” como Transcriptómica, Proteómica y Metabolómica para el análisis de las modificaciones inesperadas en los cultivos transgénicos. Con estas técnicas se podrá determinar con mayor seguridad si un OMG es sustancialmente equivalente a su correspondiente variedad no modificada. Las posibles diferencias que se detecten entre ambos organismos deben ser posteriormente estudiadas desde el punto de vista toxicológico para garantizar su seguridad (Kuiper y col., 2002).

## 1.7 Análisis avanzado de OMGs

Teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente, y con el fin de garantizar la seguridad de los OMGs como alimentos, así como el cumplimiento de la legislación en vigor, es necesario disponer de metodologías analíticas que permitan llevar a cabo su trazabilidad en la cadena de producción y comercialización, así como determinar su equivalencia sustancial en relación a la variedad no modificada. En base a estos dos objetivos, los nuevos métodos de análisis de OMGs se pueden clasificar en métodos para el análisis

del carácter transgénico de un determinado alimento y métodos de análisis para el estudio de la equivalencia sustancial.

El análisis del carácter transgénico de un alimento se realiza normalmente mediante el análisis de compuestos diana (normalmente un fragmento de ADN del nuevo inserto, la nueva proteína sintetizada o algún metabolito). Además, el análisis de estos compuestos diana es de gran utilidad para llevar a cabo el seguimiento de los productos esperados de la modificación genética durante las fases del desarrollo y producción del OMG.

Por otro lado, el estudio de la equivalencia sustancial se ha realizado tradicionalmente mediante técnicas de análisis poco informativas. Sin embargo, el desarrollo de las técnicas “ómicas” proporciona una gran oportunidad para llevar a cabo estudios más completos acerca de la composición del OMG y, por tanto, de su equivalencia sustancial. Dichas técnicas permiten el análisis de perfiles de compuestos o “profiling”.

### **1.7.1 Análisis de compuestos diana**

En los últimos años, con motivo de la aprobación de la Normativa europea sobre etiquetado de los alimentos transgénicos, se ha producido un rápido desarrollo de nuevos métodos de detección de OMGs en alimentos. En general, dichos métodos se basan en la detección de secuencias de ADN transgénicas, aunque también se han desarrollado métodos de detección de la proteína transgénica o de los metabolitos asociados a la modificación genética.

Algunas características de la molécula de ADN son de especial importancia en el desarrollo de métodos de análisis de alimentos transgénicos. En concreto, el ADN es relativamente estable a altas temperaturas, está presente en todos los tejidos biológicos y, desde un punto de vista cuantitativo, es posible establecer una relación entre la proporción de OMG y determinadas secuencias de ADN en la muestra. Estas características, junto con la disponibilidad de técnicas de amplificación específica de secuencias de ADN, han permitido el desarrollo de un gran número de métodos de detección de OMGs en alimentos tanto cuali- como cuantitativamente (García-Cañas y col., 2004a). La mayoría de estos métodos se basan en la reacción en cadena de la



polimerasa (PCR) (Saiki y col., 1985; Mullis y col., 1987; Saiki y col., 1988). Los procedimientos habituales de análisis de ADN basados en PCR para la determinación de OMGs en alimentos, constan de tres etapas básicas: extracción de ADN, amplificación de secuencias específicas y detección de productos de amplificación.

En la etapa de extracción, el principal objetivo es obtener, a partir del alimento, un extracto de ADN con la mayor pureza, calidad y rendimiento posible. Por ello, es fundamental optimizar este proceso, evitando por un lado la presencia de contaminantes (por ejemplo, compuestos fenólicos y polisacáridos) que puedan inhibir la posterior amplificación. A partir del extracto de ADN, se lleva a cabo la amplificación, mediante la técnica PCR, de las secuencias que se desean detectar. La PCR es una técnica que permite obtener *in vitro* múltiples copias de una secuencia de ADN determinada (secuencia diana) dentro de una muestra compleja (Saiki y col., 1985; Mullis y col., 1987; Saiki y col., 1988). La amplificación por PCR utiliza una polimerasa de ADN termoestable que sintetiza una hebra de ADN en dirección 5'-3' incorporando los deoxinucleótidos correspondientes a partir de un cebador (oligonucleótido) y otra cadena de ADN sencilla que actúa de molde. El proceso de amplificación se basa en repetir varias veces un ciclo con tres periodos de incubación en los cuales se produce la desnaturalización del ADN bicatenario (fase desnaturalización), seguida de la hibridación de cada molécula de ADN monocatenario con su respectivo cebador (fase hibridación) y finalmente, la síntesis de la nueva molécula de ADN (fase elongación). Las hebras de ADN sintetizadas “de novo” sirven como molde para la síntesis de nuevo ADN en los ciclos siguientes, lo que confiere un carácter exponencial a la reacción de amplificación. El producto amplificado se denomina amplicón. En la Figura 1.3 se puede ver un esquema de un ciclo de la PCR.

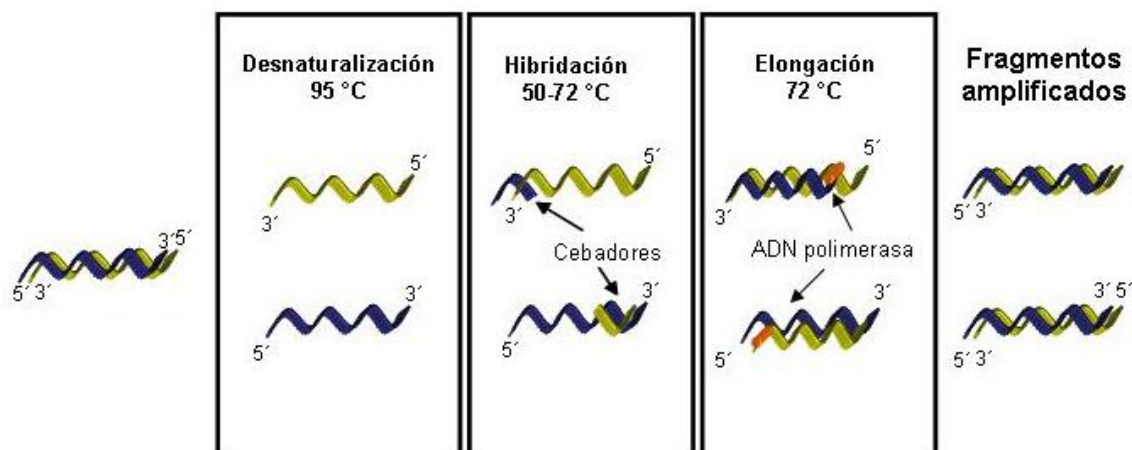


Figura 1.3. Esquema de un ciclo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

A continuación, se lleva a cabo la detección de los fragmentos de ADN amplificados mediante técnicas electroforéticas en gel. El método tradicional de análisis de fragmentos de ADN amplificados es la electroforesis convencional en geles de agarosa (AGE). Esta técnica es económica, pero es tediosa y requiere múltiples pasos que no son susceptibles de automatización. Además proporciona baja sensibilidad y resolución. Con el fin de paliar algunas de estas deficiencias, se han desarrollado métodos de electroforesis capilar en geles con sistemas de detección de fluorescencia inducida por láser (CGE-LIF), que proporcionan mayor automatismo, sensibilidad y resolución en la detección de las secuencias de ADN amplificado (García-Cañas y col., 2002a; García-Cañas y col., 2002b; García-Cañas y col., 2008a).

Dado el creciente desarrollo de nuevos OMGs, parte de los avances más significativos en esta área han ido encaminados hacia el desarrollo de métodos de detección simultánea de varios OMGs en un mismo análisis. Así por ejemplo, en la bibliografía se pueden encontrar varios ejemplos de la aplicación de la técnica PCR múltiple para la amplificación simultánea de varias secuencias diana mediante la adición de más de una pareja de cebadores en la misma mezcla de reacción (Matsuoka y col., 2001; García-Cañas y col., 2004b; García-Cañas y col., 2008b; Heide y col., 2008). A pesar de las posibilidades para el ensayo multianálisis que ofrece esta técnica, permitiendo ahorrar en tiempo y reactivos, es difícil de optimizar puesto que cada amplicón se amplifica con una eficiencia determinada, lo cual puede llevar a rendimientos de amplificación muy dispares entre las distintas secuencias a amplificar.

Recientemente, se han desarrollado varios métodos de detección múltiple basados en la ligasa de ADN. Estas técnicas combinan una primera etapa de ligación de ADN con sondas específicas y un segundo paso de amplificación por PCR empleando una pareja de cebadores universales. En base a esta idea, las técnicas de amplificación múltiple de sondas dependiente de la ligasa (MLPA) y de amplificación múltiple del genoma dependiente de la ligasa (MLGA) se han aplicado con éxito, en combinación con CGE-LIF para la detección múltiple de OMGs en alimentos (Moreano y col., 2006; Holck y col., 2009; García-Cañas y col., 2010). Entre los métodos de análisis multianálisis, cabe destacar el microarray de ADN. Los microarrays de ADN son colecciones de sondas de ADN inmovilizadas a un sustrato sólido y en localizaciones conocidas. Existen varias plataformas de microarrays de ADN con distintos sistemas de detección, pero la característica común a todas ellas, es que permiten detectar un número elevado de secuencias de ADN. Algunas de estas plataformas de microarrays están validadas para la detección de OMGs, como por ejemplo el DualChip GMO V2.0 (Eppendorf). Este dispositivo permite la detección simultánea de 11 secuencias específicas de eventos transgénicos (entre ellos varios eventos de maíz, como MON810, MON863, Bt11, T45 y soja RR) (von Götz, 2010).

El análisis cuantitativo de OMGs en alimentos está justificado por la entrada en vigor del Reglamento (CE) 1829/2003, que obliga a etiquetar un alimento que presente una concentración de OMG por encima de un valor umbral de 0.9% en relación al ingrediente. La falta de reproducibilidad de la PCR convencional (Hübner y col., 1999), así como su carácter cualitativo impiden el empleo de esta técnica para la cuantificación de OMGs en alimentos. El carácter cualitativo de la PCR convencional se debe a que la cantidad de ADN amplificado se detecta a partir del producto final de la PCR, y este no guarda una relación directa con la cantidad de secuencia diana presente al comienzo de la reacción de amplificación (Raeymakers, 1993; Freeman y col., 1999). La técnica PCR a tiempo real, o PCR cuantitativa, permite solventar esta limitación de la PCR convencional.

La PCR en tiempo real es una técnica que permite la detección del producto amplificado ciclo a ciclo. Es una técnica muy sensible, capaz de detectar el producto de amplificación a partir de pocas secuencias de ADN diana (Burns y col., 2008). La

cuantificación del ADN se realiza en la fase exponencial de la reacción, cuando la eficiencia de amplificación es todavía lineal y existe una buena correlación entre la concentración del producto amplificado y la concentración inicial de moléculas diana. Existen dos estrategias principales para detectar la acumulación del producto de amplificación. En primer lugar, el empleo de agentes intercalantes, como SYBR Green I, permite detectar la fluorescencia emitida por el intercalante cuando está unido al ADN de doble cadena después de la fase de elongación de cada ciclo de reacción (Ririe y col., 1997). Es un método inespecífico, ya que no depende de la secuencia de la molécula de ADN. Para evitar amplificaciones inespecíficas y mejorar la sensibilidad de la cuantificación, se emplean condiciones restrictivas de hibridación. Otra estrategia de detección del producto amplificado se basa en la hibridación específica del producto de PCR con sondas marcadas con fluoróforos en el extremo 5'. En este caso, existen distintas tecnologías de emisión de fluorescencia según el diseño de los fluoróforos, como TaqMan<sup>TM</sup>, Scorpion<sup>TM</sup> o Molecular Beacon<sup>TM</sup> (Whitman y col., 2008). En función del procedimiento empleado para obtener fluorescencia, se adoptará un momento u otro del ciclo de reacción para realizar la adquisición de la señal de fluorescencia. Una de las ventajas del empleo de PCR a tiempo real respecto a la PCR convencional, es que no es necesario manipular el producto de amplificación una vez amplificado, con lo que se disminuye el riesgo de contaminaciones. Además, es una técnica que cuenta con una alta capacidad de procesamiento de muestras (Wittmer y col., 1997).

Existen numerosas aplicaciones de la PCR a tiempo real para la cuantificación de OMGs en alimentos. Entre ellas destacan los métodos oficiales de la Unión Europea (Laboratorio de Referencia de la Unión Europea, <http://gmo-crl.jrc.ec.europa.eu>; Våtilingom y col., 1999; Terry y col., 2001; Hernández y col., 2001; Holck y col., 2002; Zeitler y col., 2002; Hernández y col., 2003; Babekova y col., 2009; Harikai y col., 2009; Köppel y col., 2010). Sin embargo, cabe resaltar los problemas que esta técnica presenta para determinar simultáneamente varias secuencias de ADN y la baja reproducibilidad de los análisis cuantitativos interlaboratorio con coeficientes de variación superiores a un 25% (EU Tender N. XXIV98/A3/001).

Independientemente de las técnicas electroforéticas y la PCR a tiempo real, se han desarrollado otros métodos de detección del producto amplificado. La cromatografía de

líquidos acoplada a espectrometría de masas (LC-MS) se ha empleado para la detección de secuencias específicas de ADN, amplificadas mediante PCR múltiple, de soja transgénica Roundup Ready<sup>TM</sup> (RR) (Shanahan y col., 2007). Los biosensores son otro método novedoso de detección de productos amplificados. Consisten en sondas de oligonucleótidos inmovilizadas sobre electrodos. Los productos amplificados hibridan con estos oligonucleótidos y, al hibridar, los electrodos generan una señal piezoeléctrica (Mannelli y col., 2003; Meric y col., 2004).

La detección de la proteína transgénica permite determinar los niveles de expresión del gen nuevo que se ha integrado en el genoma del organismo (Carpentier y col., 2008). Sin embargo, en ocasiones el nivel de expresión génico es bajo, y la proteína se encuentra en concentraciones por debajo del umbral de detección, lo cual dificulta su detección. Además, algunos factores, como por ejemplo la temperatura, pH, enzimas, disolventes orgánicos, sales o detergentes pueden producir la desnaturalización de las proteínas. Esta inestabilidad que presentan las proteínas es un grave inconveniente para los métodos basados en el análisis de proteínas transgénicas en alimentos procesados (Stave, 2002; Van Duijn y col., 2002).

En general, los métodos de detección de las proteínas resultantes de la modificación genética se basan en técnicas inmunológicas (Stave, 2002), es decir, en el reconocimiento específico de una proteína por un anticuerpo. Normalmente son ensayos del tipo ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) ya que proporcionan buenos resultados cuando se aplican sobre alimentos sin procesar y están indicadas para el análisis rutinario de un gran número de muestras (Lüthy, 1999).

Además de los métodos inmunológicos, se han desarrollado métodos basados en otras técnicas, como la espectrometría de masas (MS). Recientemente, se ha desarrollado un método para la caracterización de la proteína transgénica CP4-EPSPS, que se encuentra presente en cultivos transgénicos como maíz y soja. Este método emplea un fraccionamiento con cromatografía de filtración en gel (CFG) y electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE). La determinación de la concentración de la proteína transgénica se realiza mediante nano-LC acoplada a un espectrómetro de masas de tipo

cuadrupolo-tiempo de vuelo con interfase de electrospray (nLC-ESI-QTOF). Con este método se han detectado cantidades de proteína transgénica de hasta un 0.9% en semillas de soja (Fernández-Ocaña y col., 2007). Esta misma metodología se ha empleado para la determinación de otras proteínas en plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) transgénicas (Labate y col., 2004).

Aunque no hay una relación directa entre genes y metabolitos, en algunos casos la modificación genética está ligada a un cambio en alguna ruta metabólica, como resultado de la actividad de algún enzima. El análisis de metabolitos diana podría tener un mayor interés para los OMGs de segunda generación, ya que presentan variaciones en los niveles de vitaminas, aminoácidos, etc. Las técnicas analíticas que se emplean con frecuencia en el análisis de metabolitos diana son principalmente la resonancia magnética nuclear (RMN) y la MS. También se emplean varias técnicas de separación distintas, como cromatografía de gases (GC), cromatografía de líquidos (LC) y electroforesis capilar (CE), acopladas a distintos sistemas de detección. Un ejemplo del análisis de metabolitos diana es el acoplamiento de cromatografía de gases con espectrometría de masas (GC-MS) para el análisis de triptófano (Trp) en una variedad de soja con un nivel aumentado de dicho aminoácido (Inaba y col., 2007). Otro ejemplo es el empleo de LC-MS/MS para el análisis de ácido indol-3-acético (IAA) en un arroz transgénico con un nivel elevado de Trp (Morino y col., 2005).

### **1.7.2. Análisis de perfiles de compuestos o “profiling”**

La comparación de la composición entre los OMGs y sus correspondientes variedades convencionales se ha llevado a cabo en algunas ocasiones mediante procedimientos poco informativos, como análisis de la humedad, de cenizas o mediante el análisis de grupos de compuestos aislados (por ejemplo ácidos grasos, vitaminas, minerales, etc.) (Hashimoto y col., 1998; Shewmaker y col., 1999). Sin embargo, en la actualidad, existen dudas sobre la validez de estos procedimientos analíticos para evaluar las modificaciones inesperadas en los OMGs, ya que no proporcionan suficiente información (Cellini y col., 2004). Por ello, diversas organizaciones, como la EFSA o el National Research Council de EEUU, demandan nuevas metodologías analíticas para la evaluación de las modificaciones inesperadas en OMGs y han apuntado que las técnicas

“ómicas” podrían ser de gran utilidad para su estudio (National Research Council of the National Academies, 2004; EFSA, 2006). Estas técnicas se definen como un conjunto de tecnologías de alto rendimiento para la generación, procesamiento y aplicación de la información científica sobre la composición y funciones del genoma, transcriptoma, proteoma y metaboloma. Las técnicas “ómicas” permiten generar y agrupar la información a gran escala con el fin de obtener una visión más completa del sistema biológico en estudio. La ventaja fundamental de la aplicación de las técnicas “ómicas” es que permiten el estudio de cualquier organismo, adoptando una perspectiva global, en lugar de estudiar simplemente una serie de moléculas “diana”, como se viene haciendo hasta ahora, lo cual dificulta la detección de posibles modificaciones inesperadas. La EFSA considera que la Metabolómica, Proteómica, Genómica y Transcriptómica son técnicas ideales para la determinación de modificaciones inesperadas en los OMGs (EFSA, 2006).

Desde el comienzo del proyecto Genoma Humano, en la década de los 90 (National Research Council, 1988), las técnicas “ómicas” han experimentado un creciente desarrollo que ha estado motivado fundamentalmente por la necesidad de mejorar nuestro conocimiento sobre los organismos vivos. En la actualidad, estas técnicas se emplean en diversos campos de investigación relacionados con la biomedicina, la toxicología, la nutrición y el medio ambiente (Kussmann y col., 2006; Song y col., 2008). Sin embargo, el empleo de las “técnicas ómicas” se enfrenta a dificultades tales como la integración de la gran cantidad de datos obtenidos en las distintas plataformas (Metabolómica, Proteómica, Genómica, Transcriptómica) para obtener información biológica relevante (Kussmann y col., 2006). Recientemente, se ha propuesto la aplicación de la Biología de Sistemas para llevar a cabo dicha integración entre las diversas plataformas “ómicas”. La Biología de Sistemas analiza la relación entre los elementos de un sistema y su respuesta a cualquier cambio, con el objetivo de tener una mayor comprensión del sistema y sus propiedades (Hood y col., 2004). La Biología de Sistemas emplea un enfoque holístico, considerando el todo como un concepto global superior a la suma de las partes (Song y col., 2008). Este enfoque global permite comprender el funcionamiento de los procesos biológicos y obtener información de las interacciones entre los elementos de dichos procesos. Estos procesos incluyen desde rutas metabólicas sencillas, como síntesis de ácidos grasos, hasta relaciones celulares complejas. Por tanto, la Biología de Sistemas se puede aplicar a moléculas, células,



órganos, individuos e incluso ecosistemas. En la Figura 1.4 se muestra un esquema de la relación de las técnicas “ómicas” más representativas entre sí.

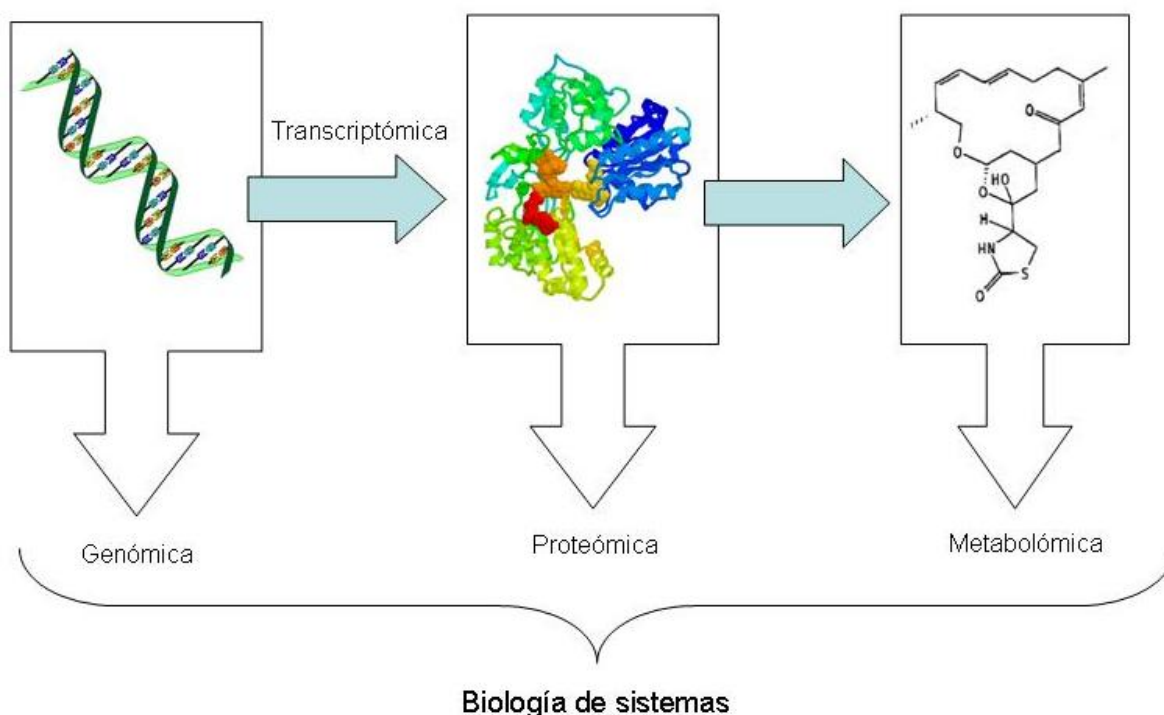


Figura 1.4. Esquema de las principales técnicas “ómicas”.

El avance de las técnicas “ómicas” no habría sido posible sin la integración de un buen número de disciplinas científicas, como la física, química, matemáticas, estadística, biología molecular y bioquímica (Suresh Babu y col., 2006). También, los últimos avances en las técnicas instrumentales de análisis han sido esenciales para el desarrollo de las técnicas “ómicas” (Issaq y col., 2008). Entre dichos avances se encuentran microarrays y técnicas avanzadas de separación electroforéticas o cromatográficas en sus diferentes formatos acopladas a modernos analizadores de masas. Además, el desarrollo de nuevas disciplinas como la bioinformática han sido fundamentales no solo para el avance de dichas técnicas, sino también para la integración e interpretación de los resultados (Zhang y col., 2008). Todo ello, junto con el incremento del número de bases de datos on-line que recogen la información obtenida en los experimentos, han sido aspectos importantes para la aplicación de estas tecnologías al estudio de diversos organismos (Song y col., 2008). En la actualidad, existe un gran número de bases de datos, que se asocian entre sí, mediante plataformas o portales, para compartir la información disponible de proteínas, metabolitos o genes. En concreto, diversos



institutos como el National Institute of Health (NIH), el European Molecular Biology Laboratory (EMBL) o el National Center for Biotechnology Information (NCBI) agrupan en sus portales varias de estas bases de datos. En la Tabla 1.3 se recogen algunos ejemplos.

**Tabla 1.3.** Algunas bases de datos actualmente disponibles y su principal área de aplicación.

<b>Nombre</b>	<b>Enlace (<a href="http://www.">http://www.</a>)</b>	<b>Base de datos</b>	<b>Ref.</b>
Genomes online Database (GOLD)	<a href="http://genomesonline.org">genomesonline.org</a>	Genómica	(Kyrpides, 1999)
Genome Project (NCBI)	<a href="http://ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=genome">ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=genome</a>	Genómica	
Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)	<a href="http://genome.jp/keg">genome.jp/keg</a>	Genómica Metabolómica	(Kanehisa y col., 2000)
Human Metabolome DataBase (HMDB)	<a href="http://hmdb.ca">hmdb.ca</a>	Metabolómica	(Wishart y col., 2007)
UniProtDK/SwissProt-TrEMBL	<a href="http://expasy.ch/sprot/">expasy.ch/sprot/</a>	Genómica Proteómica	(Bairoch y col., 1997)
Gene Ontology Annotation (GOA)	<a href="http://geneontology.org/">geneontology.org/</a>	Genómica Proteómica	(Ashburner y col., 2000)
METLIN	<a href="http://metlin.scripps.edu/">metlin.scripps.edu/</a>	Metabolómica	
KNAPSAcK	<a href="http://kanaya.naist.jp/KNAPSAcK/">kanaya.naist.jp/KNAPSAcK/</a>	Metabolómica	
GenBank	<a href="http://ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/">ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/</a>	Genómica	(Benson y col., 2008)

### 1.7.2.1. Transcriptómica

La Transcriptómica es el estudio del transcriptoma, que puede definirse como el conjunto de moléculas de ARN mensajero (ARNm) generadas en el proceso de expresión del genoma (Kussmann y col., 2006). El estudio de perfiles de expresión génica se puede llevar a cabo mediante microarrays de expresión.

Existen varios ejemplos en la literatura del empleo de microarrays de expresión para la investigación de la equivalencia sustancial en variedades transgénicas de maíz, trigo, arroz y patata (Gregersen y col., 2005; Baudo y col., 2006; Dubouzet y col., 2007; Coll y col., 2008; Coll y col., 2009; Coll y col., 2010). Existen distintos microchips comerciales para el análisis de los perfiles de expresión de multitud de organismos. Por ejemplo, el microarray de expresión de los genes del maíz de Affymetrix (Santa Clara, CA, EEUU) permite evaluar la transcripción de aproximadamente un tercio de los genes

de maíz. Esta plataforma se ha empleado para el análisis de diferencias en el proceso de transcripción entre dos variedades de maíz transgénico MON810 y sus respectivas variedades convencionales (Coll y col., 2010). En este estudio se demostró que tanto la variabilidad natural como las condiciones de cultivo afectan en mayor grado a la expresión génica que la modificación genética en maíz MON810. Por tanto, el estudio sugiere la necesidad de considerar las diferencias en los perfiles transcriptómicos entre distintas variedades y condiciones de cultivo en el análisis de riesgos de los OMGs.

#### 1.7.2.2. Proteómica

La Proteómica engloba el conjunto de técnicas de alto rendimiento que estudian las proteínas y péptidos, incluyendo su estructura, funciones y modificaciones postraduccionales (PTMs). El proteoma es dinámico y muy complejo, dado que el contenido proteico varía en función de la célula o fluido biológico de origen, de la actividad celular, de las condiciones ambientales, etc.

La Proteómica se emplea en el análisis de OMGs para estudiar su equivalencia sustancial. Para ello, es preciso realizar una comparación del proteoma de un OMG con el de su respectiva variedad no modificada. Esta comparación se puede realizar mediante diversas estrategias proteómicas. La estrategia más empleada en el análisis de OMGs se denomina “bottom-up” (Corpillo y col., 2004; Di Luccia y col., 2005; Albo y col., 2007; Rocco y col., 2008; Zolla y col., 2008) y consiste en la separación de las proteínas, la posterior hidrólisis de las proteínas de interés, y el análisis de los péptidos hidrolizados (Henzel y col., 1993). Como alternativa a esta metodología, también se puede efectuar primero la hidrólisis de la mezcla compleja de proteínas, y posteriormente la separación y análisis de los péptidos de la mezcla. Esta estrategia se denomina “shotgun”. En la Figura 1.5 se puede ver un esquema de diferentes metodologías empleadas en Proteómica.

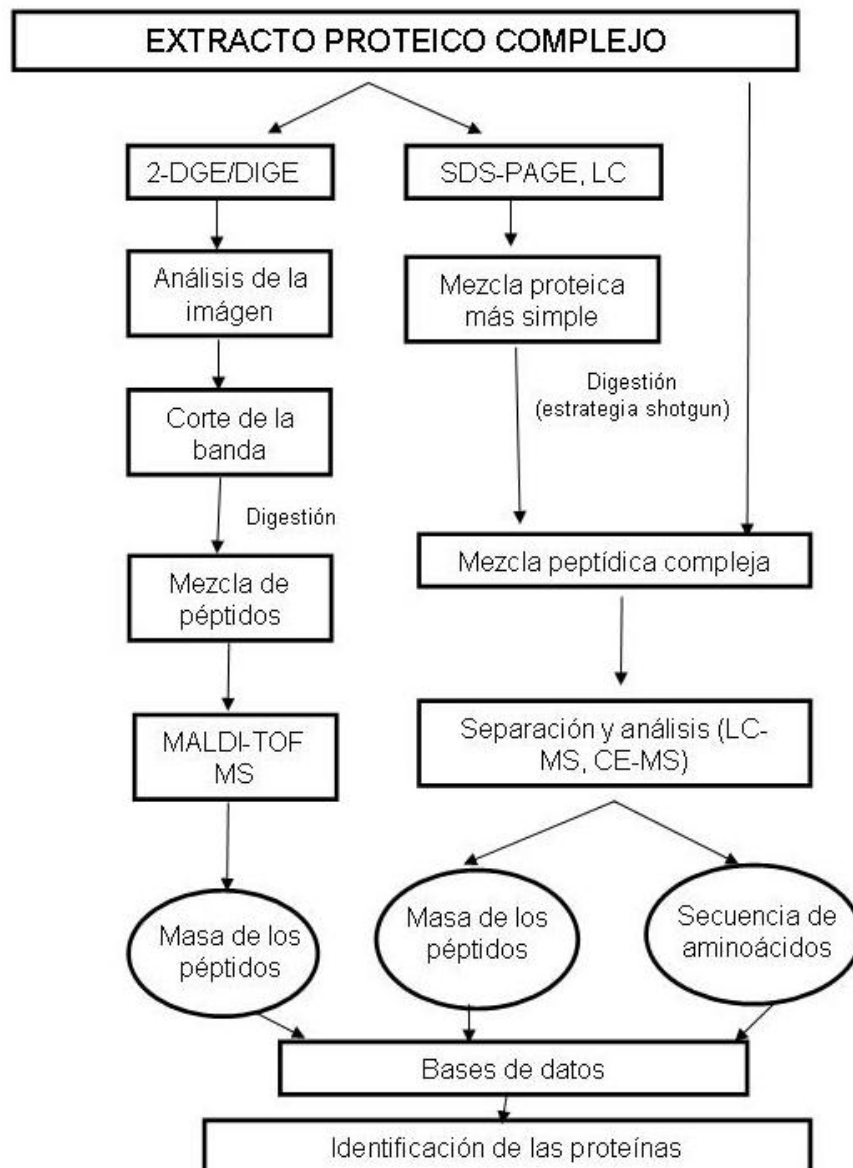


Figura 1.5. Esquema de diferentes metodologías empleadas en Proteómica.

La técnica de separación más empleada en las distintas metodologías “bottom up” es la electroforesis bidimensional en geles (2-DGE), aunque también se pueden utilizar técnicas más convencionales como PAGE. La 2-DGE es una técnica que se basa en la separación de la mezcla de proteínas en dos dimensiones. En la primera dimensión se separan las proteínas por su punto isoeléctrico, mientras que en la segunda dimensión se separan por tamaño. La 2-DGE es una técnica de separación que proporciona una gran resolución. Sin embargo es una técnica laboriosa, poco automatizada, requiere mucho tiempo, y proporciona una baja reproducibilidad, lo que dificulta la comparación entre geles. Otro inconveniente de 2-DGE es que no es adecuada para la separación de proteínas muy hidrofóbicas o con puntos isoeléctricos o pesos moleculares extremos. La

electroforesis diferencial en gel (DIGE) evita los problemas de reproducibilidad ya que permite cargar, en el mismo gel, distintas muestras. Esta técnica emplea fluoróforos para marcar las muestras, y un sistema de detección de fluorescencia, lo que permite obtener límites de detección más bajos que con 2-DGE con tinción convencional (Timms y col., 2008).

Una vez separadas las proteínas de la mezcla, se analiza la imagen de los geles obtenidos y se escinden las bandas del gel correspondientes a las proteínas de interés. Las proteínas se hidrolizan enzimáticamente y se analizan los péptidos mediante espectrometría de masas. El analizador de masas más empleado en la estrategia “bottom-up” es el MALDI-TOF (ionización-desorción por láser asistida por una matriz acoplada a un analizador de espectrometría de masas de tiempo de vuelo) (Horvath-Szanics y col., 2006).

La estrategia “bottom-up”, con 2-DGE o DIGE como método de separación, se ha empleado para el estudio de la equivalencia sustancial de variedades transgénicas de tomate, maíz y de trigo (Corpillo y col, 2004; Di Luccia y col., 2005; Albo y col., 2007; Zolla y col., 2008). En estos estudios, se han detectado diferencias en el perfil peptídico entre las variedades transgénicas y las convencionales. Sin embargo, se ha señalado que es difícil establecer si estas diferencias se deben a la variación natural, a factores ambientales, o bien a la modificación genética. Para evitar este problema es necesario caracterizar primero la variabilidad del proteoma en una planta convencional cultivada en distintas condiciones ambientales (Ruebelt y col., 2006).

La estrategia “bottom-up” es la más empleada en el estudio de la equivalencia sustancial en OMGs. Sin embargo, también se han realizado estudios proteómicos en los que se analizan las proteínas intactas. En estos estudios las técnicas de separación más empleadas son técnicas cromatográficas y electroforéticas capilares. Estas técnicas permiten el análisis de proteínas muy hidrofóbicas o con puntos isoelectrónicos extremos. Además, tienen otras ventajas con respecto a 2-DGE como por ejemplo que están totalmente automatizadas, son más reproducibles y requieren volúmenes de muestra y reactivos menores. La detección de los péptidos se lleva a cabo mediante espectrometría de masas, empleando analizadores como trampa de iones (IT-MS) o tiempo de vuelo (TOF-MS) (Rocco y col., 2008; di Carli y col., 2009; Simó y col., 2010a). El

acoplamiento de estas técnicas con espectrometría de masas permite caracterizar mezclas complejas de proteínas o péptidos (Haselberg y col., 2007; Chen y col., 2009).

Estas técnicas de separación se han empleado en la evaluación de la equivalencia sustancial en OMGs. Por ejemplo se ha empleado cromatografía de líquidos de alta eficacia en fase reversa (RP-HPLC) con columnas monolíticas y de perfusión para el análisis del perfil proteico de maíz MON810 y soja resistente al glifosato (García y col., 2009; Rodríguez-Nogales y col., 2010). El empleo de estos tipos de columnas permitió detectar diferencias en los perfiles de proteínas entre las variedades transgénicas y sus respectivas variedades convencionales. La electroforesis capilar se ha empleado para la caracterización de una variedad de soja RR a partir del análisis de su fracción proteica (García-Ruiz y col., 2007). El acoplamiento electroforesis capilar con espectrometría de masas (CE-MS), con un analizador de tiempo de vuelo se ha empleado para el estudio de los perfiles peptídicos de una soja RR y de su correspondiente línea isogénica, demostrando con este método la equivalencia sustancial entre ambas variedades (Simó y col., 2010a).

En la Tabla 1.4 se recogen algunos de los ejemplos más representativos de los estudios proteómicos de la equivalencia sustancial en OMGs. La mayoría de estos estudios emplean la estrategia “bottom-up” para el estudio de la equivalencia sustancial.

Tabla 1.4. Estudios de la equivalencia sustancial de OMGs mediante el análisis de perfiles proteicos.

Cultivo	Organismo donador	Proteína expresada	Característica	Tejido	Separación	Identificación	Ref.
Tomate	TSWV	Proteína nuclear TSWV	Resistencia a virus	Semilla	2-DGE	MALDI-TOF MS	Corpillo y col., 2004
	-	ScFv (G4)	Resistencia a virus	Hoja	DIGE	MALDI-TOF MS, $\mu$ LC-ESI-IT MS/MS	Di Carli y col., 2009
Tabaco	-	ScFv (B9)	Resistencia a virus	Hoja	DIGE	MALDI-TOF MS, $\mu$ LC-ESI-IT MS/MS	Di Carli y col., 2009
	<i>L. esculentum</i>	Prosistemia	Resistencia a insectos	Hoja	2-DGE	MALDI-TOF MS, $\mu$ LC-ESI-IT MS/MS	Rocco y col., 2008
Maíz	<i>B.thuringiensis</i>	CryIA(b)	Resistencia a insectos	Semilla	2-DGE	MALDI-TOF MS	Albo y col., 2007
	<i>B.thuringiensis</i>	CryIA(b)	Resistencia a insectos	Semilla	2-DGE	nLC-ESI-IT MS/MS	Zolla y col., 2008
Trigo	<i>N. tabacum</i>	Rab1	Mejora de propiedades funcionales	Semilla	2-DGE	MALDI-TOF MS, nESI-QqTOF MS/MS	Di Luccia y col., 2005
	<i>T. aestivum</i>	LMW-GS	Mejora de propiedades funcionales	Semilla	2-DGE	LC-ESI-QTOF MS/MS	Scossa y col., 2008
Soja	<i>A. tumefaciens</i>	CP4-EPSPS	Tolerancia a glifosato	Semilla	CE	CE-TOF-MS	Simó y col., 2010a
Patata	<i>S. tuberosum</i>	(Gen antisentido G1-1)	Retraso de la germinación	Tubérculo	-	MALDI-TOF MS	Careri y col., 2003
	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Enzima ramificadora del glucano	Fenotipo ceroso	Tubérculo	2-DGE	$\mu$ LC-ESI-IT MS/MS,	Lehesranta y col., 2005
	<i>S. tuberosum</i>	Glicoproteína	Cambios en la estructura de la pared celular	Tubérculo		$\mu$ LC-ESI-QqTOF MS/MS	
	<i>S. tuberosum</i>	AdoMetDC	Modificación en el metabolismo	Tubérculo			

### 1.7.2.3. Metabolómica

La Metabolómica se encarga del estudio sistemático de los metabolitos (Fiehn, 2001). Los metabolitos son las moléculas de bajo peso molecular que se producen a partir de los procesos químicos o enzimáticos, como resultado del metabolismo celular, por ejemplo iones inorgánicos pequeños, aminoácidos, flavonoides o lípidos (Baggett y col.,

2002). Al igual que el proteoma y el transcriptoma, el metaboloma es dinámico, es decir, varía en función de las condiciones ambientales, de la actividad celular, etc.

La Metabolómica se aplica en el estudio de OMGs al análisis de las modificaciones inesperadas y de la equivalencia sustancial. La metodología empleada en los análisis metabolómicos consta generalmente de cuatro etapas distintas: preparación de la muestra, análisis de los metabolitos, tratamiento estadístico de los resultados e identificación de los metabolitos.

El objetivo de la preparación de la muestra es obtener el mayor número de metabolitos posible. La extracción y detección de metabolitos presenta gran dificultad puesto que estos compuestos poseen propiedades físico-químicas diferentes. Por tanto, se suelen emplear varias técnicas distintas para la detección, que se complementan entre sí (Baggett y col., 2002). Las técnicas analíticas más empleadas en estudios metabolómicos son RMN y MS. La RMN es una técnica analítica que permite el estudio y elucidación de la estructura de las moléculas. La RMN es una técnica analítica de alta resolución que ha demostrado un gran potencial en estudios metabolómicos si bien una de sus principales limitaciones es su reducida sensibilidad (Dumas y col., 2006). La MS, por otro lado, es una técnica analítica que permite obtener información acerca de la masa molecular y de la estructura de los compuestos, mediante la ionización de las moléculas y la separación de los iones formados. Es una técnica idónea para el análisis de metabolitos debido a su alta resolución, sensibilidad, robustez y al amplio intervalo de concentraciones que puede analizar. Además, se trata de una técnica versátil que permite el análisis de compuestos con propiedades muy diversas.

La tercera etapa en los análisis metabolómicos consiste en el tratamiento estadístico de los datos. En primer lugar se lleva a cabo un procesamiento previo de los datos (corrección de la línea de base, alineamiento y normalización), ya que el número de datos obtenidos en los análisis metabolómicos suele ser muy grande. A continuación, se realiza un análisis multivariante con los datos procesados. El análisis multivariante es un conjunto de métodos estadísticos que se emplea para el estudio de las contribuciones de los factores que afectan a un proceso. Algunos ejemplos de estos métodos son el análisis de componentes principales (PCA), el análisis discriminante o el modelado suave independiente de analogía de clases (SIMCA) (Soria, 2006). Con estas herramientas

estadísticas se pueden determinar los principales compuestos que permiten diferenciar entre un OMG y su respectiva variedad convencional.

Finalmente, el último paso del análisis metabolómico consiste en la identificación de los metabolitos. Para ello, se utilizan bases de datos disponibles en internet. Entre ellas destaca la Human Metabolome Database (HMDB) (Wishart y col., 2007). Actualmente esta base de datos (<http://www.hmdb.ca>) contiene información acerca de 7900 metabolitos, 1500 fármacos, 2900 contaminantes ambientales y 2000 constituyentes de los alimentos, los cuales pueden encontrarse en el cuerpo humano (Wishart y col., 2009). La Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG, <http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>) es otra base de datos que contiene información sobre el metabolismo de un gran número de organismos distintos (por ejemplo tiene identificados más de 50000 metabolitos de plantas), con lo que es muy útil para la determinación de metabolitos en cultivos transgénicos.

En la Tabla 1.5 se recogen algunas de las aplicaciones de la Metabolómica en el estudio de la equivalencia sustancial de OMGs. Como se puede observar en dicha Tabla, las técnicas más empleadas son la RMN y la MS acopladas a distintas técnicas de separación.

En términos generales, la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas es la técnica analítica más empleada en el análisis de perfiles metabólicos, debido a la alta resolución, sensibilidad y sobre todo a la facilidad del acoplamiento entre GC y MS. Mediante GC-MS se pueden analizar tanto metabolitos volátiles como no volátiles, tras su derivatización previa. Esta técnica se ha empleado en la detección de modificaciones inesperadas en patatas transgénicas con modificaciones en el metabolismo de la sacarosa (Roessner y col., 2001). Se encontraron alteraciones en los niveles de algunos disacáridos como trealosa, aminoácidos, ácidos orgánicos y metabolitos implicados en la glicolisis. También se ha empleado para el estudio de la equivalencia sustancial de variedades transgénicas de arroz, soja, maíz o tomate (Roessner-Tunali y col., 2003; Bernal y col., 2008; Zhou y col., 2009).



Tabla 1.5. Aplicaciones de la Metabolómica en el estudio de la equivalencia sustancial en OMGs.

Cultivo	Organismo donador	Proteína expresada	Característica	Tejido	Técnica	Ref.
Arroz	<i>B.thuringiensis</i>	Toxina Bt	Resistencia a insectos	Grano	GC-EI-Q MS	Zhou y col., 2009
Frambuesa	RBDV	Proteína de movimiento del virus	Resistencia a virus	Fruta	GC-EI-Q MS	Malowicki y col., 2008
Soja	<i>Petunia hybrida</i>	Enzima EPSPS	Tolerancia al glifosato	Grano	GC-EI-Q MS	Bernal y col., 2008
Maíz	<i>B.thuringiensis</i>	Toxina Bt	Resistencia a insectos	Grano	GC-EI-Q MS	Bernal y col., 2008
					RMN	Piccioni y col., 2009
					RMN	Manetti y col., 2006
Pepino	<i>Thaumatococcus daniellii</i>	Taumatina-II	Sabor dulce	Fruta	GC-EI-Q MS GC-TOF MS	Zawirska-Wojtasiak y col., 2009
Lechuga	<i>Escherichia coli</i>	ToB7	Incremento Asn	Hoja	RMN	Sobolev y col., 2010
Tomate	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	S-adenosilmetionina descarboxilasa	Incremento capacidad oxidante	Fruta	RMN	Mattoo y col., 2006
	<i>Vitis Vinifera</i>	Enzima STS	Síntesis de resveratrol	Fruta	LC-ESI-Q MS	Nicoletti y col., 2007
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Hexoquinasa	Modificación del metabolismo de carbohidratos	Hoja y fruta	GC-EI-Q MS	Roessner-Tunali y col., 2003
Patata	<i>S. tuberosum</i>	Enzima del metabolismo de almidón y sucrosa	Modificación de la composición del almidón	Tubérculo	GC-EI-Q MS	Roessner y col., 2001
	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Fructoquinasa, $\alpha$ -glucosidasa, tetraciclina, S-adenosilmetionina	Biosíntesis de almidón, morfología de la hoja y producción de etileno	Tubérculo	GC-EI-Q MS	Shepherd y col., 2006
	<i>Cynara scolymus</i>	Proteínas 1-SST, 1-FFT	Síntesis de inulina	Tubérculo	GC-TOF MS LC-Q MS	Catchpole y col., 2005

Tabla 1.5. (cont) Aplicaciones de la Metabolómica en el estudio de la equivalencia sustancial en OMGs.

Cultivo	Organismo donador	Proteína expresada	Característica	Tejido	Técnica	Ref.
Trigo	<i>Hordeum vulgare</i>	$\beta$ -1,3-glucanasa	Actividad antifúngica	Hoja	LC-ESI-IT MS/MS	Ioset y col., 2007
Arroz	<i>N. tabacum</i>	Antranilato sintasa	Mejora nutricional	Células cicatrizantes	LC-ESI-Q MS/MS	Morino y col., 2005
	<i>Z. mays</i>	Genes reguladores C1 & R-S	Producción de flavonoides	Hojas	LC-ESI-IT MS/MS	Shin y col., 2006
		Dihidroflavonol-4-reductasa	Tolerancia al estrés	Planta y células cicatrizantes	CE-ESI-MS	Takahashi y col., 2006
		Proteína YK1	Tolerancia al estrés	Hojas y células cicatrizantes	FT-ICR-MS	Takahashi y col., 2005
Tabaco	<i>E. coli &amp; Streptomyces hygroscopicus</i>	Enzima NADPH-GDH	Tolerancia a la sequía	Semilla	FT-ICR-MS	Mungur y col., 2005

La cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas es una técnica complementaria a GC-MS para el análisis metabolómico, ya que puede analizar compuestos no volátiles con un mayor intervalo de polaridades. Además, es posible acoplar una mayor variedad de analizadores de masas. Aunque no presenta tantas aplicaciones en el análisis metabolómico de OMGs como GC-MS, cabe destacar el empleo de LC-MS para el análisis de perfiles de polifenoles, como por ejemplo de flavonoides en arroz transgénico (Shin y col., 2006) o estilbenos en tomate transgénico (Nicoletti y col., 2007).

La electroforesis capilar y su acoplamiento a espectrometría de masas también son técnicas complementarias a GC-MS y LC-MS debido a que pueden analizar sin derivatización previa compuestos no volátiles de gran polaridad y con carga eléctrica. Recientemente se ha empleado electroforesis capilar con un detector de fluorescencia inducida por láser (CE-LIF) para el análisis quiral de aminoácidos en maíz transgénico (Bt11) y convencional (Herrero y col., 2007). En este estudio se detectó la presencia de D-aminoácidos (D-Arg, D-Ser y D-Asn) en maíz MON810 y no se detectaron en su respectiva variedad convencional. También se han detectado, mediante CE-MS, modificaciones inesperadas en las concentraciones de metabolitos en variedades transgénicas de arroz (Takahashi y col., 2006) y patata (Bianco y col., 2003).

La espectrometría de masas se puede emplear también en el modo de infusión directa, sin acoplar a técnicas de separación, para el análisis de perfiles metabólicos. Cuando se emplea de manera aislada se deben utilizar analizadores de masas de alta resolución como TOF-MS (con una exactitud en la masa de  $<10$  ppm) o espectrometría de masas de resonancia ion-ciclotrón con transformada de Fourier (FT-ICR-MS) que proporciona una exactitud en la medida de la masa de  $<1$  ppm y límites de detección por debajo de femtomoles o incluso attomoles. La elevada resolución obtenida con estos dos equipos permite determinar las fórmulas elementales de miles de compuestos diferentes. Sin embargo, la exactitud en la masa y la elevada resolución no son siempre suficientes para identificar todos los metabolitos de una mezcla compleja mediante infusión directa. Además, la infusión directa en un espectrómetro de masas proporciona menos sensibilidad que la espectrometría de masas acoplada a alguna técnica de separación en el análisis de alimentos debido al efecto producido por la matriz del alimento. En un estudio reciente, se han detectado diferencias en los perfiles metabólicos de una variedad de arroz transgénico respecto a su correspondiente arroz convencional mediante el empleo de FT-ICR-MS (Takahashi y col., 2005). También se detectaron diferencias en los perfiles metabólicos de plantas de tabaco transgénico respecto a su variedad convencional (Mungur y col., 2005).

## 1.8 Perspectivas futuras en el análisis de alimentos transgénicos

La ISAAA (Servicio Internacional para la Adquisición de Aplicaciones Agrobiotecnológicas) estima que la adopción global de cultivos biotecnológicos por país y por número de agricultores y hectáreas se duplicará a lo largo de su segunda década de comercialización (entre 2006 y 2015). Además, estima que en 2015 serán 40 los países que incorporen a su producción cultivos transgénicos y habrá una oferta en continua expansión de nuevos cultivos transgénicos adecuados para satisfacer las necesidades prioritarias de la sociedad, especialmente la de los países en desarrollo de Asia, América Latina y África (James, 2009). Un ejemplo es la inminente autorización y comercialización de variedades de maíz resistentes a la sequía, o del ya mencionado “arroz dorado” en China, India o Filipinas una vez se superen los problemas técnicos de su desarrollo.

El previsible incremento tanto en la producción como en el número de OMGs pone de manifiesto la necesidad de disponer de metodologías analíticas avanzadas que permitan su estudio. Estas técnicas, de acuerdo con las recomendaciones de la EFSA, deben aplicarse en dos aproximaciones analíticas distintas. Por un lado, se deben desarrollar técnicas que detecten y cuantifiquen de forma rápida y sensible los OMGs en diferentes matrices alimentarias. Por otra parte, deben desarrollarse metodologías analíticas que permitan obtener de forma fiel los perfiles transcriptómicos, proteómicos y metabolómicos de los diferentes OMGs, para obtener información precisa que permita evaluar y confirmar (o no) su equivalencia sustancial.

### **1.9. Objetivo general**

El objetivo general de esta Tesis Doctoral es desarrollar procedimientos analíticos avanzados para la caracterización de OMGs en alimentos, así como para la detección e identificación de posibles modificaciones no esperadas a nivel proteómico y metabolómico en los OMGs. El desarrollo de estos procedimientos analíticos debe permitir determinar de manera más convincente la equivalencia sustancial de los OMGs con sus respectivas líneas isogénicas no transgénicas y facilitar su trazabilidad mediante la obtención de perfiles específicos de las variedades transgénicas estudiadas.

Para el adecuado cumplimiento de este objetivo, se han empleado diversas técnicas analíticas, en concreto:

- Técnicas de extracción selectiva, como PLE, y otros métodos de extracción con disolventes orgánicos.
- Procedimientos basados en la amplificación de secuencias de ADN específicas.
- Técnicas electroforéticas capilares de separación, como electroforesis capilar en gel o electroforesis capilar en zona libre.
- Técnicas de análisis acopladas a las técnicas de separación, como ultravioleta, fluorescencia inducida con láser, espectrometría de masas de trampa de iones,

espectrometría de masas de tiempo de vuelo, y técnicas de espectrometría de masas de infusión directa como FT-ICR-MS.

- Procedimientos quimiométricos para el análisis de los datos obtenidos y de múltiples bases de datos para la identificación de compuestos.

La combinación de estas técnicas ha permitido el desarrollo de dichos procedimientos analíticos.



**CAPÍTULO II: Detección de levaduras  
modificadas genéticamente en vino  
mediante el uso combinado de PCR-múltiple  
y CGE-LIF**





## 2. Detección de levaduras modificadas genéticamente en vino mediante el uso combinado de PCR múltiple y CGE-LIF

### 2.1. Introducción

El desarrollo de nuevas cepas de levaduras mediante la tecnología del ADN recombinante es uno de los avances más recientes en la industria vinícola. La aplicación de dicha tecnología ha permitido mejorar determinados aspectos de la producción y de la calidad del vino (Cebollero y col., 2007). En EEUU y Canadá, se ha autorizado recientemente la comercialización de dos cepas transgénicas de *S. cerevisiae* (FDA GRAS Notice 000120, 2003; FDA GRAS Notice 000175, 2005). La cepa transgénica ML01 permite obtener vinos con menor acidez (Husnik y col., 2006; Husnik y col., 2007), mientras que el empleo de la cepa transgénica ECMo01 favorece la reducción de etilcarbamato en el vino (Coulon y col., 2006). Otras modificaciones genéticas en *S. cerevisiae* permiten mejorar la producción de glicerol (Michnick y col., 1997; Remize y col., 2000; Eglinton y col., 2002), favorecer la liberación de terpenos al medio (Sánchez-Torres y col., 1996; Ganga y col., 1999; Manzanares y col., 2003), incrementar la producción de ésteres volátiles (Lilly y col., 2000), mejorar la estabilidad química del vino (González-Ramos y col., 2008) o la autólisis de la levadura durante la segunda fermentación en los vinos espumosos (Cebollero y col., 2005).

Como ya se ha mencionado en el Capítulo I, la controversia acerca de los OMGs ha dado lugar a la elaboración de una Normativa específica para el desarrollo, liberación al ambiente, comercialización y etiquetado de los alimentos que contienen, o son producidos a partir de OMGs. En consecuencia, en los últimos años, se ha trabajado en el desarrollo de nuevos procedimientos analíticos para la detección y cuantificación de OMGs en alimentos. Generalmente, los métodos de determinación de OMGs en alimentos se basan en la amplificación del ADN mediante la técnica PCR. La amplificación de secuencias de ADN en matrices alimentarias complejas depende en gran medida de la calidad y pureza del extracto obtenido. La presencia de taninos, polisacáridos y polifenoles en vino tiene un efecto negativo en la reacción de amplificación, ya que dichos compuestos pueden interferir con el ADN o inhibir la actividad de la ADN polimerasa (Maliyakal, 1992; Tsai y col., 1992; Young y col.,

1993; Jobes y col., 1995; Wilson, 1997; Ogunjimi y col., 1999). Además, algunos procesos enzimáticos y bioquímicos pueden degradar el ADN genómico durante la fermentación y envejecimiento del vino, reduciendo la cantidad de secuencias diana intactas disponibles durante la etapa de amplificación (Savazzini y col., 2006). Por tanto, para llevar a cabo la detección de levaduras modificadas genéticamente en vino mediante técnicas de amplificación de ADN, es fundamental disponer de métodos eficaces de extracción de ADN a partir de la muestra. En este sentido, Savazzini y Martinelli han desarrollado varias estrategias para incrementar el rendimiento de la extracción. Dichas estrategias se basan en la concentración del ADN mediante la incubación de las muestras de vino durante largos períodos de tiempo (1 a 2 semanas) (Savazzini y col., 2006). Otra estrategia ha consistido en partir de volúmenes grandes de muestra (100-200 mL) con el fin de obtener extractos con un rendimiento de ADN suficiente para su posterior amplificación mediante PCR (Siret y col., 2000; Siret y col., 2002; Baleiras-Couto y col., 2006; Salinas y col., 2009). Además, otros autores han logrado minimizar el efecto inhibitor de los compuestos fenólicos llevando a cabo una segunda amplificación a modo de PCR anidada de las secuencias de interés (Simón y col., 1996). Sin embargo, la estrategia más utilizada para solventar los problemas de inhibición ha consistido en la adición de aditivos, como por ejemplo, polivinilpirrolidona (PVPP), y carbón activo, que interaccionan con los polifenoles durante la extracción y permiten su eliminación del extracto (Wilson, 1997).

La PCR múltiple es una técnica adecuada para la detección simultánea de varios OMGs en el mismo análisis (García-Cañas y col., 2004a; Hernández y col., 2005; Zhou y col., 2007; Xu y col., 2007). La aplicación de esta técnica, normalmente requiere una etapa previa de optimización de varios parámetros que afectan a la amplificación, así como a la composición de la mezcla de reacción. Por lo general, dicha optimización, demanda el empleo de una técnica de análisis de los productos amplificados que proporcione buena resolución y elevada sensibilidad. En este sentido, CGE-LIF es una técnica sensible que ha demostrado su utilidad en la optimización de métodos basados en PCR múltiple, así como en la detección de múltiples dianas de ADN en matrices alimentarias complejas (García-Cañas y col., 2004d).

## 2.2. Objetivo y plan de trabajo

El objetivo del presente trabajo es el desarrollo de un procedimiento analítico, basado en el uso combinado de PCR múltiple y CGE-LIF, que permita la detección rápida y sensible de levaduras modificadas genéticamente en muestras de vino.

Para cumplir dicho objetivo se ha llevado a cabo el siguiente plan de trabajo:

**A.** Selección y optimización de las condiciones de extracción de ADN de levadura a partir de muestras de vino.

**B.** Diseño y optimización del sistema de amplificación mediante PCR múltiple.

**C.** Análisis de los productos amplificados mediante CGE-LIF.

## 2.3. Materiales y métodos

### 2.3.1. Reactivos y muestras

Los reactivos empleados en la extracción, la amplificación y la separación de ADN de levaduras en vino fueron adquiridos en distintas casas comerciales. Para la extracción se empleó PVPP de Applichem (Darmstadt, Alemania), fenol de LabClinics (Madrid, España), cloroformo y 2-propanol de Scharlau (Barcelona, España), dodecilsulfato sódico (SDS), alcohol isoamílico y etanol de Merck (Darmstadt, Alemania), sorbitol de Sigma (St Louis, MO, EEUU), Zimoliasa-20T de Seikagaku Biobusiness (Tokio, Japón), acetato potásico de Panreac Química S.A. (Barcelona, España) y RNAsa A de Roche (Barcelona, España). Para el cultivo de las levaduras se empleó peptona y extracto de levadura de CONDA Pronadisa (Madrid, España) y glucosa de Scharlau. Los reactivos empleados en las reacciones de amplificación fueron: ADN polimerasa Amplitaq Gold, tampón de PCR GeneAmp II, deoxinucleótidos (dUTP, dATP, dGTP y dCTP) y  $MgCl_2$  de Applied Biosystems (Madrid, España). Los cebadores fueron adquiridos de Bonsai Biotechnologies (Alcobendas, España) y la enzima uracil ADN glicosilasa de New England Biolabs (Beverly, MA, EEUU). Para la preparación del

tampón de separación se emplearon: 2-hidroxietilcelulosa (HEC, Pm: 90000) de Aldrich (Milwaukee, WI, EEUU), Tris (hidroximetil) aminometano (TRIS), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) de Sigma (St Louis, MO, EEUU) y YOPRO-1 de Molecular Probes (Leiden, Países Bajos). Los tampones de separación se almacenaron a 4°C hasta su uso. El agua empleada se desionizó mediante un sistema Milli-Q de Millipore (Bedford, MA, EEUU).

**Muestras de levadura.** Se emplearon las cepas EC1118 y EKD-13 de *S. cerevisiae*. La levadura EC1118 es una cepa convencional comprada a Lallemand Inc. (Montreal, Canadá). La cepa EKD-13 es una cepa modificada que se obtuvo mediante la tecnología del ADN recombinante a partir de la cepa EC1118. La modificación genética en la cepa EKD-13 consiste en la delección de dos alelos del gen *knr4*. Parte de la secuencia de dichos alelos se sustituyó por los marcadores *ARO4-OFP* y *KanMX4*, que confieren resistencia a la p-fluorofenilalanina (PFP) y a la geneticina, respectivamente (González-Ramos y col., 2009). La cepa transgénica EKD-13 fue donada por el Dr. R. González del Instituto de Ciencias de la Vid y el Vino (CSIC-UR-CAR, La Rioja, España). Con el fin de obtener extractos de ADN genómico de cada una de las cepas, se inocularon por separado en alícuotas de 5 mL de medio YPD (2% (m/v) glucosa, 2% (m/v) peptona y 1% (m/v) extracto de levadura) y se incubaron a 30°C durante 24 h.

**Muestras de vino.** La muestra de la variedad de vino tinto Petit Verdot fue donada por el Dr. J. M. Mateo del Laboratorio Agroalimentario y Estación Enológica de Jerez (Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía, Cádiz, España). Las muestras de vino experimental fueron donadas por el Dr. R. González del Instituto de Ciencias de la Vid y el Vino. Para la producción del vino experimental, se emplearon dos tipos de mosto: un mosto multivarietal (CIDA) y un mosto monovarietal (Graciano). Los mostos sin clarificar (200 mL) se inocularon con las cepas EKD-13 y EC1118, por separado, y la fermentación se llevó a cabo a 25°C. La producción de CO<sub>2</sub> se estimó mediante la pérdida de peso de los mostos, y la fermentación se dio por finalizada tras dos días de peso constante. El final del proceso se corroboró mediante el análisis por HPLC de los principales metabolitos producidos en la fermentación (glucosa, fructosa, glicerol y etanol). En los dos casos, la fermentación se realizó en ausencia de hollejos. Además de estos vinos, obtenidos a partir de mostos no

clarificados, se inocularon también con las cepas EC1118 y EKD-13 por separado, 200 mL de mosto CIDA previamente centrifugado.

**Muestras patrón de ADN.** Para la determinación del tamaño de los fragmentos de ADN mediante electroforésis, se emplearon distintas muestras patrón. Dichas muestras patrón consisten en mezclas de moléculas de ADN de tamaño y concentración conocidos. En concreto, se emplearon:

Muestra patrón de ADN de Biotools (Madrid, España) que contiene moléculas de ADN de 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 y 1000 pares de bases en una concentración total de 500 µg/mL.

Muestra patrón de ADN-III de Roche Diagnostics S.L. que contiene moléculas de ADN de 125, 564, 831, 947, 1375, 1584, 1904, 2027, 3530, 4268, 4973, 5148 y 21226 pares de bases en una concentración total de 250 µg/mL.

Muestra eCAP dsDNA TestMix de Beckman que contiene moléculas de ADN de 72, 118, 194, 234, 271, 281, 301, 603, 872, 1078 y 1353 pares de bases en una concentración total de 200 µg/mL.

### **2.3.2. Extracción de ADN de levadura**

#### **2.3.2.1. Cultivos de levadura**

La extracción de ADN a partir de los cultivos de levadura se llevó a cabo mediante el protocolo del kit comercial MasterPure™ Yeast DNA Purification Kit de Epicentre Biotechnologies (Madison, WI, EEUU). Se centrifugaron 1.5 mL de cultivo de levadura a 14000 rpm durante 2 min. El sobrenadante se descartó y el precipitado se incubó con 300 µL de la disolución de lisis del kit a 65°C durante 15 min. A continuación, se llevó a cabo la precipitación de las proteínas mediante la adición de 150 µL del reactivo de precipitación del kit. La suspensión se centrifugó a 14000 rpm durante 10 min y el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio. A continuación, se llevó a cabo la precipitación de los ácidos nucleicos mediante la adición de 500 µL de 2-propanol. El

precipitado se lavó con 70% (v/v) de etanol y se disolvió en 50 µL de tampón TE (10 mM Tris-HCl, pH 8.0 y 1 mM EDTA). Los extractos obtenidos se incubaron con 1 µL de RNasa A (5 µg/µL) a 60°C durante 30 min. A continuación, los extractos se purificaron con 50 µL de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (50:48:2, v/v/v) y se centrifugaron durante 10 min a 14000 rpm. Se llevó a cabo una segunda extracción a partir de la fase acuosa con 1 volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1, v/v) y se centrifugó de nuevo a 14000 rpm durante 10 min. Finalmente, el ADN de la fase acuosa superior se precipitó con 0.1 volúmenes de 3 M acetato sódico (pH 5.2) y con 2 volúmenes de etanol 100%. La suspensión se centrifugó a 14000 rpm durante 15 min y el precipitado se lavó con 500 µL de 70% (v/v) etanol. Una vez seco, el precipitado se disolvió en 50 µL de tampón TE.

#### 2.3.2.2. Muestras de vino

Con el fin de obtener extractos de ADN amplificables mediante PCR de las muestras de vino, se evaluaron tres procedimientos de extracción. Para este estudio se empleó la muestra de vino Petit Verdot. La evaluación de los procedimientos de extracción se realizó en base a la obtención de extractos de ADN con suficiente calidad y rendimiento para la amplificación de un fragmento del gen *mpr2* mediante PCR.

Inicialmente, se realizó una centrifugación de 15 mL de vino (10000 rpm a 5°C durante 5 min). El precipitado obtenido en la centrifugación inicial se suspendió en 2 mL de agua desionizada. La suspensión se centrifugó a 14000 rpm durante 5 min y se desechó el sobrenadante. Este paso de lavado se realizó por duplicado. A continuación, se llevó a cabo la extracción del ADN a partir del pellet mediante tres procedimientos distintos (métodos A, B y C). Además, durante la optimización de la extracción se estudió el efecto de la adición del aditivo PVPP a la muestra, mediante el siguiente procedimiento: Después de realizar el segundo lavado del precipitado con agua, se añadió 1 mL de una suspensión 10% (m/v) de PVPP acuosa y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. La suspensión se centrifugó a 14000 rpm durante 10 min. Tras desechar el sobrenadante, se continuó la extracción del ADN a partir del pellet mediante los métodos de extracción A, B y C, que se describen a continuación.

El método A consistió en el empleo del kit comercial MasterPure™ Yeast DNA Purification según las instrucciones del fabricante descritas en el apartado 2.3.2.1. Los métodos B y C se basaron en el protocolo desarrollado por Querol y col. (Querol y col., 1992) con algunas modificaciones. Durante el desarrollo de los métodos B y C, el precipitado sólido se suspendió en 500 µL de una disolución 1 M de sorbitol y 0.1 M de EDTA (pH 7.5). A continuación, la disolución se incubó con 20 µL de una disolución de 2.5 mg/mL de Zimoliasa-20T a 37°C durante 90 min. Posteriormente, la disolución se centrifugó a 14000 rpm durante 2 min. El precipitado se suspendió en 500 µL de una disolución 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) y 1 mM EDTA y se añadieron 10 µL de una disolución 20% (m/v) de SDS. La disolución se incubó con 1 µL de RNasa A (5 µg/µL) a 65°C durante 30 min. A continuación, se añadieron 200 µL de una disolución 5 M acetato potásico y la disolución se mantuvo en hielo durante 5 min. Posteriormente, la disolución se centrifugó a 14000 rpm durante 15 min. A partir de esta etapa, las extracciones mediante los métodos B y C siguen protocolos distintos. En el método B, el ADN en el sobrenadante se precipitó con 1 volumen de 2-propanol. El precipitado se lavó con 500 µL de 70% (v/v) etanol y se resuspendió en 50 µL de tampón TE. En el método C, se añadió un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1, v/v/v) al sobrenadante y se centrifugó la disolución (14000 rpm durante 10 min). La fase acuosa se purificó empleando unas columnas del kit QIAamp DNA mini kit de Qiagen (Madrid, España). Finalmente, el ADN se eluyó de la columna con 50 µL de tampón TE.

Una vez finalizada la extracción, se efectuó la determinación espectrofotométrica de la concentración de ADN en los extractos empleando un Nanodrop 1000 de Thermo Scientific (Madrid, España). Además, los extractos se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 0.7% (m/v) para verificar el rendimiento de extracción y el tamaño aproximado de los ácidos nucleicos purificados.

### 2.3.3. Amplificación de secuencias de ADN mediante PCR

#### 2.3.3.1. Diseño de cebadores

En base a la secuencia de ADN genómico de EKD-13, se llevó a cabo el diseño de los cebadores empleando el programa Primer3 (Rozen y col., 2000). Las secuencias de las parejas de cebadores diseñadas (KmTF/KmTR y KmPF/KmPR) se recogen en la Tabla 2.1. Además, se seleccionó una tercera pareja de cebadores, SCF1/SCR1 (Tabla 2.1), con el objeto de amplificar una secuencia específica de *S. cerevisiae* (Salinas y col., 2009). La amplificación de dicha secuencia se utilizó como control de la amplificación del ADN de *S. cerevisiae* en los extractos. Las secuencias de los seis cebadores se evaluaron in-silico con el programa PrimerList (Kalendar, 2010), con el fin de detectar posibles interacciones entre ellos y por lo tanto, verificar su compatibilidad durante el diseño del método de PCR múltiple.

Tabla 2.1. Cebadores empleados en el análisis de ADN de levaduras en vino.

Nombre	Secuencia (5'-3')	Tamaño amplicón (pb)	Referencia
SCF1	GGACTCTGGACATGCAAGAT	104	Salinas y col., 2009
SCR1	ATACCCTTCTTAACACCTGGC		
KmTF	CAGAAAGTAATATCATGCGTCAATCG	174	Presente estudio
KmTR	AGCTCGGTACCTCGATGATAAG		
KmPF	ATCCCCCATGGCTATCACGA	200	Presente estudio
KmPR	GCACGTCAAGACTGTCAAGG		

#### 2.3.3.2. Composición de la mezcla de reacción

Las reacciones de PCR simple se llevaron a cabo en una mezcla acuosa con un volumen final de 50 µL. Las concentraciones de los distintos componentes en la reacción de amplificación de cada secuencia por separado fueron las siguientes: 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 2.6 mM MgCl<sub>2</sub>, 250 µM de dATP, 250 µM de dGTP, 250 µM de dCTP, 500 µM de dUTP, 0.5 µM de cada cebador, 1 U de la ADN polimerasa AmpliTaq Gold, 0.25 U de uracil-ADN glicosilasa (UDG) y 50 ng de ADN. Las reacciones de PCR múltiple se prepararon añadiendo las 3 parejas de cebadores a la misma mezcla de reacción. Las concentraciones de los componentes en la reacción de amplificación mediante PCR múltiple fueron idénticas a las empleadas en las reacciones



de PCR simple, excepto las concentraciones de las parejas de cebadores, que fueron 0.7, 0.2 y 0.1  $\mu\text{M}$  de las parejas SCF1/SCR1, KmTF/KmTR y KmPF/KmPR, respectivamente.

### 2.3.3.3. Programa de termociclado

Las mezclas de reacción se incubaron en un termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf, España) siguiendo los parámetros de temperatura y tiempo indicados en la Tabla 2.2.

Tabla 2.2. Programa de termociclado para la amplificación de ADN de levaduras en vino.

		<b>Temperatura/tiempo</b>	
Actividad UDG		37 °C	10 min
Desnaturalización Inicial		95 °C	10 min
40 ciclos	Desnaturalización	95 °C	30 seg
	Hibridación	60 °C	30 seg
	Elongación	72 °C	30 seg
Elongación Final		72 °C	10 min

### **2.3.4. Separación de mezclas de ADN**

Para llevar a cabo el análisis de las muestras de ADN se empleó un equipo de electroforesis capilar P/ACE-MDQ (Beckman Instruments) dotado con un módulo láser de argón ionizado con longitud de onda de excitación de 488 nm y longitud de onda de emisión de 520 nm. El instrumento estuvo controlado por un PC y el Software 32 Karat (Beckman). Para la separación, se emplearon columnas capilares de sílice de 75  $\mu\text{m}$  de diámetro y 60 cm de longitud total (50 cm de longitud hasta el detector) de Composite Metal Services (Worcester, UK). Las muestras se inyectaron en el extremo catódico durante 40 segundos a 0.5 psi. Los capilares fueron acondicionados previamente a su utilización mediante un lavado de 30 min con 0.1 M HCl. Entre análisis, se realizó un lavado con agua MilliQ durante 15 min a 45 psi, seguido de 0.1 M HCl durante 4 min a 30 psi y 5 min de tampón de separación a 40 psi. El tampón de separación estaba compuesto por 20 mM Tris, 10 mM ácido fosfórico, 2 mM EDTA, 500 nM YOPRO-1 y 4.5% (m/v) HEC, a pH 7.3. Las separaciones se realizaron a 45°C con un voltaje de -217 V/cm (modo polaridad reversa).

Durante la optimización de la extracción, los extractos de ADN y los productos de PCR simple, se separaron mediante electroforesis convencional en geles de agarosa (CONDA Pronadisa) en tampón TAE (40 mM Tris-acetato, pH 8.0 y 1 mM EDTA). La separación se efectuó en una cubeta conectada a una fuente de alimentación EC105 de E-C Apparatus Corporation (Milford, MA, EEUU). Se aplicó una diferencia de potencial constante a temperatura ambiente. La concentración de agarosa utilizada para elaborar el gel fue de 0.7% (m/v), para la separación de ADN genómico, y de 2% (m/v) para la separación de los productos de PCR. A continuación, se realizó la tinción del gel en tampón TAE con GelRed (BioTium, Madrid, España). Las bandas de ADN se visualizaron con luz UV empleando el transiluminador Universal Hood II de BioRad (Hercules, CA, USA) dotado con una cámara que permite digitalizar la imagen del gel y posteriormente guardarla en soporte informático, empleando la aplicación Chemidoc XRS del programa Quantity One (versión 4.6.9 de BioRad).

## **2.4. Resultados y discusión**

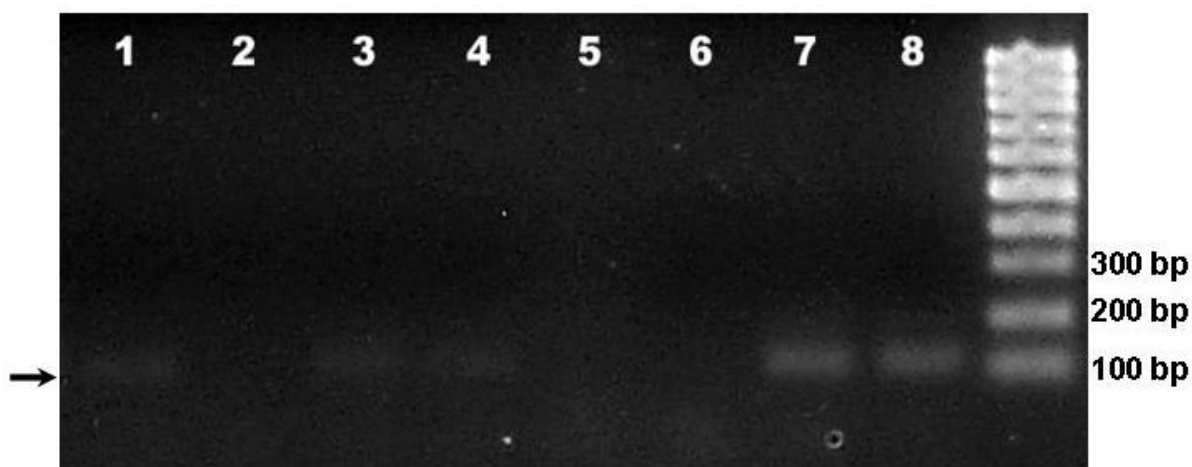
### **2.4.1. Optimización del método de extracción de ADN de levadura en muestras de vino**

Inicialmente, se efectuaron extracciones de ADN a partir de los cultivos de levadura empleando el kit comercial. Como era de esperar, el empleo del kit comercial con este tipo de muestras proporcionó extractos con buen rendimiento de extracción (concentraciones de ADN superiores a 200 ng/μL) y calidad (valores medios de la relación de densidad óptica a 260nm /280 nm ( $DO_{260/280}$ ) y a 260nm /230 nm ( $DO_{260/230}$ ) de 1.6 y 2.5, respectivamente). Por otro lado, el análisis espectrofotométrico y electroforético de los extractos obtenidos con el mismo kit a partir de muestras de vino indicaron rendimientos de extracción muy bajos y co-purificación de sustancias contaminantes. El análisis electroforético de las reacciones de amplificación con la pareja de cebadores SCF1/SCR1 (Tabla 2.1) a partir del ADN obtenido mostró amplificación del fragmento de ADN esperado únicamente en las reacciones de los extractos procedentes de los cultivos de levadura, corroborando la falta de calidad y rendimiento en los extractos obtenidos a partir de vino.

El principal objetivo de esta parte del trabajo fue por tanto desarrollar un método de extracción de ADN de levadura a partir de muestras de vino que proporcionara rendimiento y pureza adecuados para su posterior amplificación por PCR. Para llevar a cabo este objetivo, se evaluaron tres métodos de extracción (A, B y C). Los tres métodos se ensayaron empleando alícuotas de 15 mL de muestra de vino Petit Verdot. Como se ha descrito en la sección de Materiales y Métodos, el método A se basó en el kit comercial MasterPure™, mientras que los métodos B y C consistieron en el empleo del enzima Zimoliasa-20T. Ambos métodos difieren en la etapa final de purificación, que en el método B se lleva a cabo mediante precipitación con 2-propanol y en el método C mediante una columna comercial (ver Materiales y Métodos, sección 2.3.2). Además, se estudió el efecto de la adición de PVPP en el rendimiento y calidad del extracto. Para ello, en un paso previo a las extracciones mediante los tres métodos descritos, se añadió 1 mL de una suspensión de 10% (m/v) de PVPP a la muestra, como se describe en la sección de Materiales y Métodos. A modo de control, también se realizaron extracciones a partir de la muestra sin la adición de PVPP.

El análisis electroforético en geles de agarosa al 0.7% (m/v) no mostró bandas correspondientes a ADN genómico en ninguno de los extractos obtenidos, indicando rendimientos de extracción bajos en todos los casos. Los mejores valores de concentración, estimados espectrofotométricamente, se obtuvieron en los extractos obtenidos con el método B (con valores superiores a 50 ng/μL). Sin embargo, en los geles se observaron bandas de bajo peso molecular, que normalmente se atribuyen a la co-purificación de ARN. Por otra parte, se obtuvieron valores de la relación  $DO_{260/230}$  inferiores a 0.4 en los extractos obtenidos sin la adición de PVPP, lo que indica la presencia de contaminantes (probablemente, compuestos fenólicos). En general, se observó un efecto negativo en el rendimiento de extracción como consecuencia de la adición de PVPP. Concretamente, se observó que los rendimientos de extracción disminuyeron un 10, 67 y 78% en los extractos obtenidos con la adición de PVPP mediante los métodos B, A y C, respectivamente, comparados con los extractos obtenidos sin la adición de PVPP. Sin embargo, a pesar de la disminución del rendimiento, la adición del PVPP fue necesaria para obtener extractos con la calidad suficiente para permitir su amplificación mediante PCR, como se puede observar en las líneas 1, 3 y 4 de la Figura 2.1. En todos los casos se observó una inhibición de la

amplificación del fragmento control, debida probablemente a la co-purificación de compuestos inhibidores en los extractos de ADN (Figura 2.1, líneas 2, 5 y 6).



**Figura 2.1.** Electroforesis convencional en gel de agarosa al 2% (m/v), de los productos de PCR obtenidos con la pareja de cebadores SCF1/SCR1 a partir de los extractos de ADN procedentes de 15 mL de vino extraídos en distintas condiciones. Líneas 1, 3 y 4, muestras tratadas con PVPP; líneas 2, 5 y 6, muestras sin la adición de PVPP. Líneas 1 y 2, extractos obtenidos mediante el método A; líneas 3 y 5, extractos obtenidos mediante el método B; líneas 4 y 6, extractos obtenidos mediante el método C. Líneas 7 y 8, extractos de 1.5 mL de levadura convencional EC1118 cultivada en medio YPD obtenidos mediante el método comercial MasterPure™ Yeast DNA Purification Kit, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Como se observa en la Figura 2.1, las bandas correspondientes al ADN amplificado en los extractos obtenidos a partir del vino mostraron señales muy bajas, indicando la falta de calidad y/o rendimiento de todos los extractos. En consecuencia, se llevó a cabo la optimización de las condiciones de extracción. Para ello, se seleccionó el método A puesto que había proporcionado los mejores resultados en cuanto a la pureza (valores de  $DO_{260/230}$  superiores a 0.7 y no se detectaron bandas asociadas a la presencia de ARN). En primer lugar, se ensayó un volumen inicial de muestra superior a 15 mL. En este caso, el empleo de un volumen de muestra de 50 mL permitió duplicar el rendimiento de la extracción (de 20 a 44 ng/ $\mu$ L) y obtener valores aceptables de  $DO_{260/280}$  (superiores a 1.7). A pesar de que el análisis electroforético (AGE) de los extractos indicó un elevado grado de degradación del ADN obtenido del vino, el análisis de los extractos amplificados mediante PCR demostró que los extractos eran amplificables, permitiendo la detección de la secuencia específica de *S. cerevisiae*.

A continuación, con el fin de evaluar el método con otros tipos de muestras, se empleó el método A en la extracción de las muestras de vino experimental obtenidas con las cepas EC1118 y EKD-13. Sin embargo, no se obtuvieron extractos amplificables para la

secuencia específica de *S. cerevisiae*. Estos resultados se pueden explicar dada la diferente composición de los vinos, que también se hizo evidente por la obtención de pellets de mayor tamaño durante las primeras etapas de la extracción. En consecuencia, se adaptó el método A para la extracción de las muestras de vino experimental, mediante el empleo de volúmenes mayores (el doble) de las soluciones y reactivos del kit que los recomendados por el fabricante. De este modo, se obtuvieron extractos con rendimientos y valores indicadores de pureza superiores (Tabla 2.3). Aunque el ADN del extracto presentó un alto grado de degradación, se detectó la secuencia específica de *S. cerevisiae* en todos los extractos amplificados.

**Tabla 2.3.** Concentración y relación entre las densidades ópticas a 260 nm/230 nm y a 260 nm/280 nm de los extractos de ADN de las muestras de vino obtenidos en las condiciones óptimas de extracción.

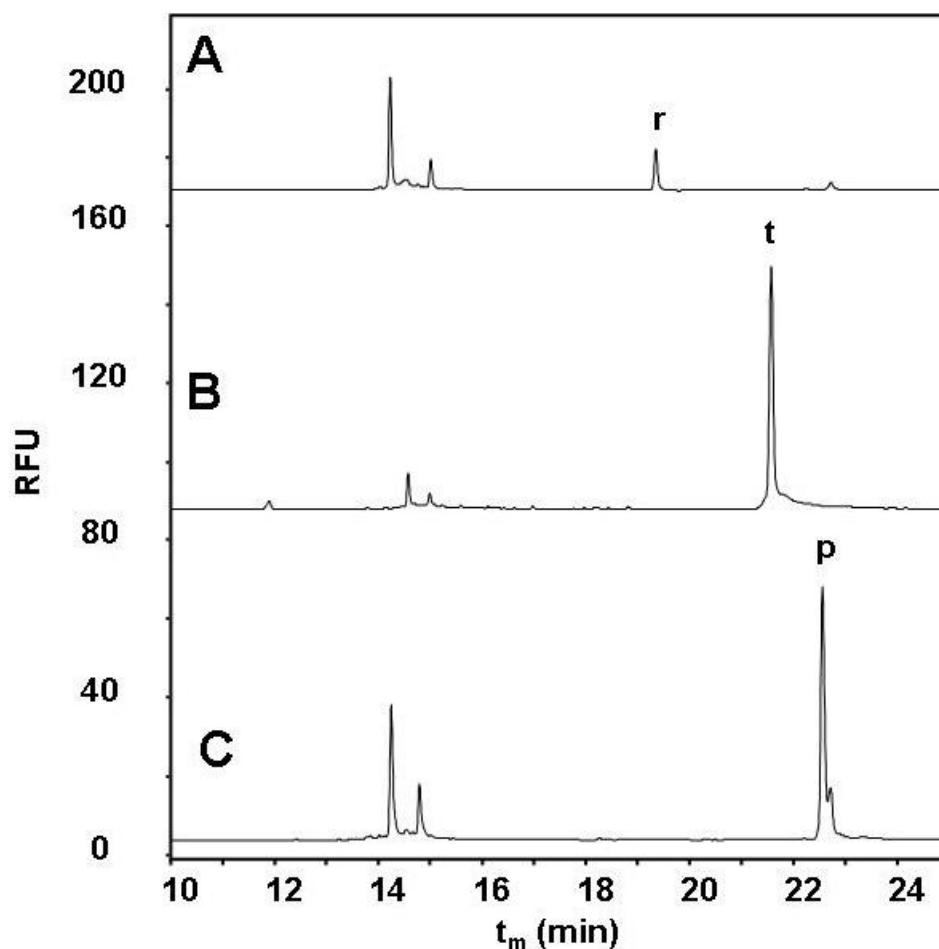
Cepa	Tipo de vino	C ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	DO <sub>260/280</sub>	DO <sub>260/230</sub>
EC1118 Convencional	CIDA	2.43	1.93	2.10
	Graciano	2.67	1.90	1.85
	CIDA (mosto clarificado)	2.72	1.89	2.20
EKD-13 Modificada	CIDA	0.80	1.99	2.45
	Graciano	1.72	1.92	2.14
	CIDA (mosto clarificado)	0.67	1.84	1.80

#### 2.4.2. Diseño y optimización de la PCR múltiple para la detección de la cepa transgénica EKD-13

En este trabajo, los cebadores se diseñaron en base a una de las construcciones transgénicas empleadas durante el desarrollo de la cepa transgénica EKD-13. Esta construcción transgénica contiene la región codificante del gen *KanMX4* (de la cepa DH5 $\alpha$  de *E. coli*), flanqueada por las secuencias del promotor y terminador del gen *knr4*, homólogas a las secuencias de la cepa no transgénica EC1118 (González Ramos y col., 2009). En base a estas secuencias, se diseñó una pareja de cebadores (KmPF/KmPR, Tabla 2.1) que permitieran la amplificación de una secuencia de 200 pb, específica de la construcción transgénica. El cebador KmPR está constituido por parte de la secuencia del promotor de *knr4* y parte de una secuencia procedente del vector empleado en la transformación (pDKNR4-3), situada entre el promotor y la región codificante de *KanMX4*. El otro cebador (KmPF) es complementario a la región

codificante de *KanMX4*. Con el fin de detectar la cepa EKD-13 de manera inequívoca, se diseñó una segunda pareja de cebadores (KmTF/KmTR, Tabla 2.1), para la amplificación de otro fragmento específico de la construcción transgénica. En este caso, se realizó el diseño con el fin de amplificar una región de 174 pb que constituye la región de unión entre la región codificante de *KanMX4* y el terminador de *knr4*. Además, se incluyó una tercera pareja de cebadores (SCF1/SCR1, Tabla 2.1) con el fin de disponer de un control de la amplificación del ADN de *S. cerevisiae* en los extractos. Dicho sistema de amplificación se basa en la detección de una secuencia de 104 pb del gen *mrp2* que codifica para una proteína ribosomal de *S. cerevisiae* (Salinas y col., 2009). La especificidad de esta secuencia se ha estudiado en 23 cepas de *S. cerevisiae* y 12 especies descritas en vinos y mostos (Salinas y col., 2009).

Como se puede observar en el electroforegrama de la Figura 2.2A, el análisis de los extractos de ADN de levadura amplificados con la pareja de cebadores SCF1/SCR1 mostró un fragmento de ADN de 104 pb correspondiente a la secuencia del gen *mrp2* de *S. cerevisiae* (pico r). Para verificar la especificidad de los cebadores KmPF/KmPR y KmTF/KmTR, diseñados para detectar la cepa transgénica, se analizaron mediante CGE-LIF las reacciones de amplificación de un extracto de ADN de EKD-13, obtenidas con las dos parejas de cebadores por separado. Los electroferogramas de las Figuras 2.2B y 2.2C muestran los picos correspondientes a los dos amplicones obtenidos con la pareja de cebadores KmTF/KmTR (pico t) y KmPF/KmPR (pico p), respectivamente. Por otro lado, el análisis electroforético de las reacciones de amplificación del extracto de ADN de EC1118 con estas parejas de cebadores únicamente mostraron el producto de PCR esperado en el caso de la secuencia de específica de *S. cerevisiae* (pico r), corroborando la especificidad de las parejas de cebadores diseñadas.



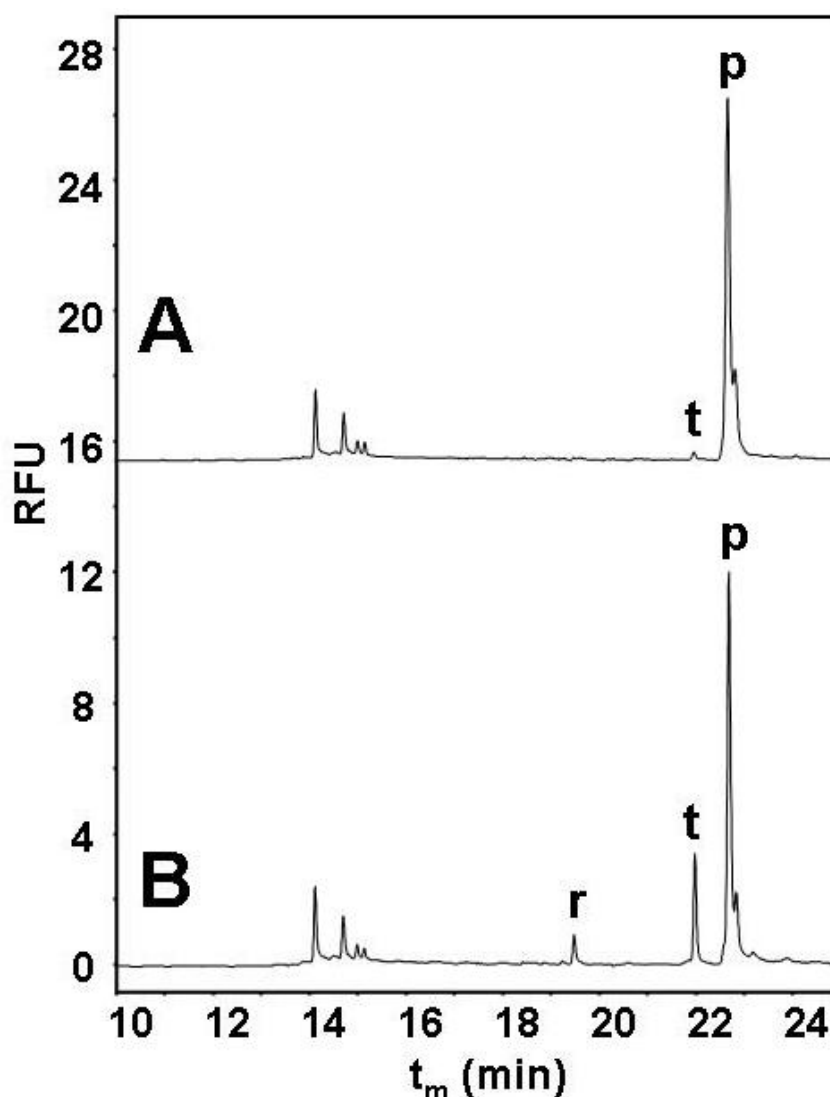
**Figura 2.2.** Electroferograma por CGE-LIF de los productos de PCR obtenidos a partir de un extracto de ADN de la cepa transgénica EKD-13 empleando las parejas de cebadores: A) SCF1/SCR1; B) KmTF/KmTR; C) KmPF/KmPR. Condiciones de separación: capilar de sílice fundida de 60 cm de longitud (50 cm longitud efectiva). Temperatura de separación: 45°C Voltaje: -13 kV. Tiempo de inyección 40 s (0.5 psi).

A continuación, se verificó el tamaño de los fragmentos de ADN obtenidos experimentalmente, comparándolo con el esperado teóricamente. Para ello, se utilizaron los datos de los tiempos de migración ( $t_m$ ) correspondientes a los fragmentos de ADN del marcador eCAP dsDNA TestMix de Beckman desde 72 a 271 pb. Se representó el logaritmo del número de pares de bases frente al inverso del tiempo de migración y se obtuvo la recta de regresión ( $R^2=0.991$ ,  $n=5$ ) correspondiente a la ecuación  $\log(\text{pb}) = 4.27 - 43.86/t_m$ . Esta ecuación se utilizó para determinar el número de pares de bases de los nuevos fragmentos de ADN en función de sus tiempos de migración. El valor calculado para el fragmento del pico r fue de 100 pb, muy próximo al valor teórico (104 pb). Para los picos t y p, se obtuvieron unos valores experimentales de 170 y 193 pb (valores teóricos de 174 y 200 pb). Los errores cometidos en la estimación del tamaño de los picos r, t y p son del 3.8, 2.3 y 3.5 % respectivamente, lo que demuestra que

CGE-LIF es una herramienta fiable para la estimación del tamaño de nuevos fragmentos de ADN obtenidos mediante PCR.

A continuación, con el objetivo de minimizar el número de reacciones necesarias para la detección inequívoca de EKD-13 en muestras de vino, se desarrolló un método de PCR múltiple. Las reacciones de PCR múltiple se prepararon añadiendo las 3 parejas de cebadores en la misma mezcla de reacción. Las condiciones de amplificación fueron las mismas que en la PCR simple, excepto las concentraciones de las parejas de cebadores, que fueron 0.5  $\mu\text{M}$  para la pareja SCF1/SCR1 y 0.1  $\mu\text{M}$  para las parejas KmTF/KmTR y KmPF/KmPF. En la Figura 2.3A, se muestra el electroferograma de los productos amplificados mediante PCR múltiple de extractos de ADN obtenidos de los cultivos de levadura EKD-13. Como se observa en la Figura 2.3A, en las condiciones de PCR múltiple ensayadas no se detectó la amplificación de todos los fragmentos de ADN esperados. Con el fin de detectar la amplificación de las tres secuencias a partir del extracto de EKD-13, se llevó a cabo la optimización de las concentraciones de los cebadores en sucesivas etapas de amplificación en base a las intensidades de los picos obtenidas mediante CGE-LIF (García-Cañas y col., 2004c; García-Cañas y col., 2008b; García-Cañas y col., 2010). Finalmente, las concentraciones óptimas que proporcionaron la amplificación de los tres fragmentos de ADN fueron las siguientes: 0.7  $\mu\text{M}$  de SCF1/SCR1, 0.2  $\mu\text{M}$  de KmTF/KmTR y 0.1  $\mu\text{M}$  de KmPF/KmPF. En la Figura 2.3B se muestra el electroferograma de los productos de PCR obtenidos de la amplificación de un extracto de ADN de EKD-13 en estas condiciones óptimas de amplificación.



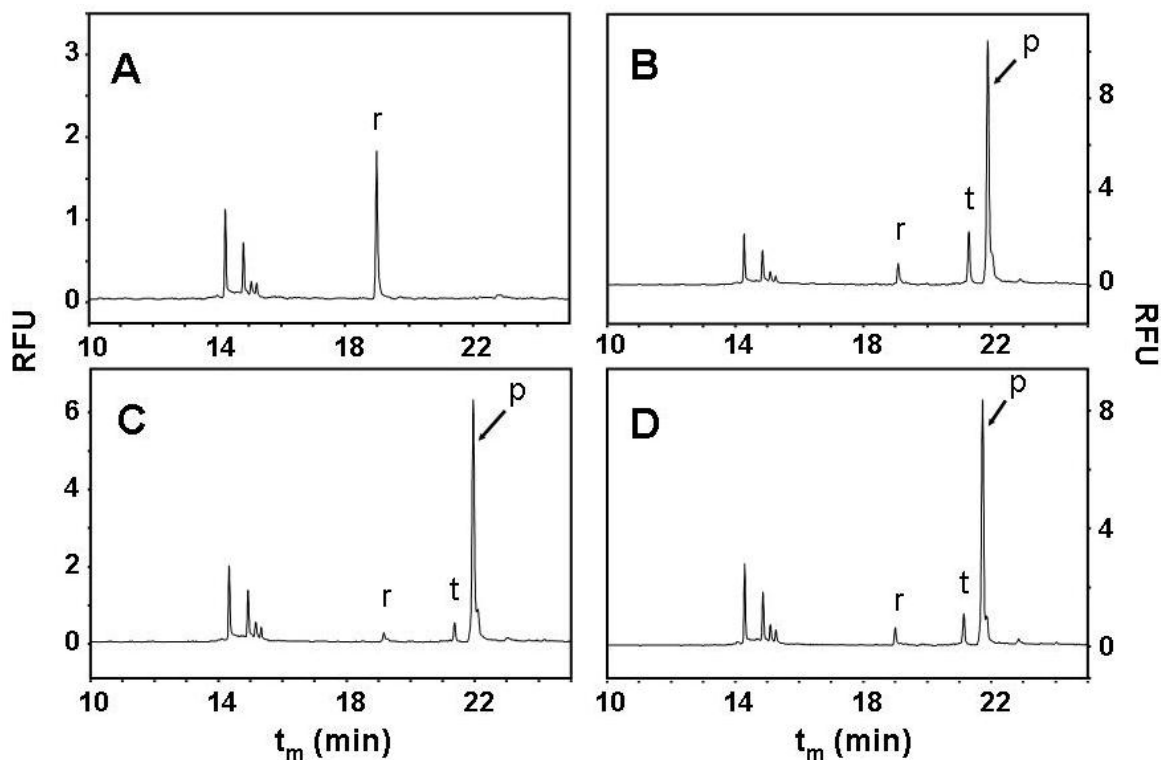


**Figura 2.3.** Electroferogramas por CGE-LIF de los productos de amplificación múltiple obtenidos a partir de un extracto de ADN de la cepa transgénica EKD-13. Concentraciones de las parejas de cebadores: A) 0.5  $\mu$ M SCF1/SCR1; 0.1  $\mu$ M KmTF/KmTR; 0.1  $\mu$ M KmPF/KmPR. B) 0.7  $\mu$ M SCF1/SCR1; 0.2  $\mu$ M KmTF/KmTR; 0.1  $\mu$ M KmPF/KmPR. Las condiciones de separación fueron idénticas a las de la Figura 2.2.

#### 2.4.3. Análisis de las muestras de vino mediante el método combinado PCR-múltiple y CGE-LIF

Con el fin de verificar si el método desarrollado era adecuado para la detección de la cepa EKD-13 en vino, se llevaron a cabo amplificaciones mediante PCR múltiple de los extractos de ADN obtenidos de las muestras de vino experimental. Como se observa en los electroforegramas obtenidos de los análisis de las reacciones de amplificación (Figura 2.4), el pico r, correspondiente al fragmento de control de la amplificación, se detectó en todas las amplificaciones lo que demuestra la fiabilidad del método desarrollado. Por otro lado, los picos t y p, correspondientes a las secuencias específicas

de la cepa transgénica, se detectaron en las amplificaciones del vino producido con EKD-13 (Figura 2.4B-D), mientras que no se detectaron en los vinos producidos con la cepa convencional EC1118 (Figura 2.4A).



**Figura 2.4.** Electroferogramas por CGE-LIF de las reacciones de amplificación múltiple de los extractos de ADN de: A) vino CIDA obtenido de mostos clarificados fermentado con la cepa convencional EC1118; B) vino CIDA obtenido de mostos clarificados fermentado con la cepa transgénica EKD-13; C) vino Graciano fermentado con la cepa transgénica EKD-13; D) vino CIDA obtenido de mostos no clarificados fermentado con la cepa transgénica EKD-13.

Como se muestra en el análisis electroforético de la Figura 2.4, no se observaron diferencias en los rendimientos de amplificación entre los extractos de vino obtenido a partir de mosto clarificado (Figura 2.4B) y los extractos de vino procedente de mosto sin clarificar (Figura 2.4D). Este resultado muestra la validez del método de PCR múltiple-CGE-LIF desarrollado en este trabajo, incluso en muestras de vino en las que es de esperar que el contenido de ADN total sea más abundante y la matriz más compleja.

## 2.5. Conclusiones

- a. En el presente trabajo se ha llevado a cabo el desarrollo de una metodología basada en la combinación de PCR múltiple y CGE-LIF para la detección rápida y sensible de la levadura transgénica EKD-13 en muestras de vino.
- b. Se ha optimizado un nuevo procedimiento de extracción, basado en el uso combinado de PVPP y un kit comercial, para la obtención de extractos de ADN de levadura con calidad y rendimiento adecuados para su amplificación por PCR a partir de muestras de vino.
- c. La aplicación de dicha metodología permite detectar de manera específica la presencia de la cepa transgénica EKD-13 de *S. cerevisiae* en muestras de vino. El tiempo total del análisis es inferior a un día.



**CAPÍTULO III: Estudio de la fracción  
proteica, correspondiente a las zeínas, en  
muestras de maíz transgénico y  
convencional mediante CE-ESI-IT-MS y CE-  
ESI-TOF-MS**



### **3. Estudio de la fracción proteica, correspondiente a las zeínas, en muestras de maíz transgénico y convencional mediante CE-ESI-IT-MS y CE-ESI-TOF-MS**

#### **3.1. Introducción**

##### **3.1.1. Electroforesis capilar**

La electroforesis capilar es un conjunto de técnicas de separación basadas en la diferente movilidad electroforética de las sustancias en disolución bajo la acción de un campo eléctrico (Jorgenson y col., 1981). Las características principales de la electroforesis capilar son:

- Elevada rapidez de análisis.
- Elevadas eficacias.
- Requiere volúmenes pequeños de reactivos y de muestra.

Además, la continua evolución de sus distintos modos de separación y esquemas de detección (UV-Visible, diodo array, fluorescencia inducida por láser, espectrometría de masas, etc.), permiten el análisis de forma automatizada de una gran variedad de analitos que van desde pequeños iones hasta macromoléculas y microorganismos (García-Cañas y col., 2007).

##### **3.1.2. Acoplamiento electroforesis capilar-espectrometría de masas (CE-MS)**

En los últimos años, el acoplamiento entre la electroforesis capilar como técnica analítica de separación y MS como sistema de detección ha despertado un gran interés entre la comunidad científica. Este interés se debe fundamentalmente a que en el acoplamiento CE-MS, se combinan la rapidez del análisis, el alto poder de resolución, y el consumo muy pequeño de muestra y disolventes proporcionados por la electroforesis capilar, con la selectividad del análisis y la información estructural que proporciona la espectrometría de masas. Para llevar a cabo el acoplamiento de una técnica que trabaja

en fase líquida, como es la electroforesis capilar, con un espectrómetro de masas en el que las sustancias deben estar en fase gaseosa, se requiere una interfase adecuada. Se han descrito diversas interfases que se pueden emplear en dicho acoplamiento (Gelpí, 2002), como por ejemplo la interfase MALDI, la interfase ESI (Stutz, 2005), la interfase de ionización química a presión atmosférica (APCI) (Tanaka y col., 2003), o la interfase de plasma de acoplamiento inductivo (ICP) (Yin y col., 2008). La interfase ESI es la más utilizada en la actualidad, y se ha empleado en numerosas aplicaciones. Esta interfase permite el análisis de compuestos polares y/o de alto peso molecular (hasta 100000 Da) (Fenn y col., 1989). Además, al ser una técnica de ionización suave, permite la ionización de los compuestos con una reducida fragmentación de los mismos. Sin embargo, tiene ciertas limitaciones, como por ejemplo, la incompatibilidad con algunas sustancias no volátiles que a menudo se emplean en los electrolitos de separación, así como la dificultad de analizar sustancias de elevada hidrofobicidad.

Una vez producida la transferencia de iones desde la fase líquida hasta la fase gaseosa en la interfase, los iones son dirigidos hacia el analizador de masas. En el acoplamiento CE-MS se pueden emplear tanto analizadores de masas tradicionales, como por ejemplo los cuadrupolos (Q), las trampas de iones (IT) o los analizadores de tiempo de vuelo (TOF), como otros detectores más avanzados (resonancia ion-ciclotrón con transformada de Fourier, FT-ICR), o sistemas en tándem, como por ejemplo analizadores Q-TOF, IT-TOF o el más clásico triple cuadrupolo (QqQ) (Klampfl y col., 2009; Rávelo-Pérez y col., 2009). El espectrómetro de masas de tiempo de vuelo separa los iones basándose en la distinta velocidad que adquieren en el interior del analizador. Los iones son extraídos y acelerados desde la cámara de ionización hasta el tubo de vuelo mediante un campo electrostático que les aporta una elevada energía cinética. El analizador de trampa de iones consiste en un electrodo anular y dos electrodos laterales, todos ellos con geometría hiperbólica, que poseen una perforación que permite la entrada y la salida de los iones. Una vez que los iones se encuentran atrapados dentro de la trampa se puede llevar a cabo, en función del objetivo, el análisis de las masas o el aislamiento de un ión precursor y su posterior fragmentación.



### 3.1.3. Análisis de perfiles de proteínas de maíz

Como se ha mencionado en el Capítulo I, se han realizado estudios de los perfiles de proteínas de distintas variedades de maíz transgénico y convencional empleando técnicas de elevada resolución, como la electroforesis en dos dimensiones (Albo y col., 2007), la cromatografía de líquidos en fase reversa acoplada a espectrometría de masas (López y col., 2009; Rodríguez-Nogales y col., 2010), o la electroforesis capilar en zona libre (Sazelova y col., 2010).

El acoplamiento CE-MS se ha empleado para el análisis de perfiles tanto de proteínas como de metabolitos (Simó y col., 2005; Coon y col., 2008; Harada y col., 2009; Bunz y col., 2010). Erny y col. llevaron a cabo la comparación de perfiles de la fracción proteica soluble en alcohol de maíz transgénico MON810 y su respectiva variedad convencional, empleando este acoplamiento con un analizador de trampa de iones (Erny y col., 2007).

Algunos trabajos sugieren que la detección de proteínas mediante espectrometría de masas depende en gran medida de los parámetros instrumentales de la interfase y del analizador (Vaidyanathan y col., 2004). Por tanto, es esencial efectuar una selección adecuada de estos parámetros durante el desarrollo de cualquier procedimiento basado en CE-MS que lleve por objeto el estudio de los perfiles proteicos en mezclas complejas.

## 3.2. Objetivo y plan de trabajo

El objetivo de este trabajo es llevar a cabo el análisis proteómico de la fracción de zeínas en maíz convencional y transgénico empleando dos estrategias analíticas distintas, una basada en el análisis mediante CE-ESI-TOF-MS y otra basada en CE-ESI-IT-MS.

Con el fin de lograr el objetivo descrito se estableció el siguiente plan de trabajo:

A. Extracción de la fracción proteica, soluble en alcohol, de muestras de maíz.

**B.** Optimización de los parámetros de detección de las proteínas de maíz mediante CE-ESI-IT-MS y CE-ESI-TOF-MS.

**C.** Análisis de la fracción proteica, correspondiente a las zeínas, en extractos de muestras de maíz transgénico MON810 y su correspondiente variedad convencional.

### 3.3. Materiales y métodos

#### 3.3.1. Muestras y reactivos

Los reactivos empleados en la extracción y el análisis de la fracción de zeínas de maíz fueron adquiridos en distintas casas comerciales. Para la extracción se emplearon: 2-mercaptoetanol de Fluka (Buchs, Suiza), ácido fórmico de Riedel-de Haën (Seelze, Alemania), acetonitrilo grado HPLC de Lab-Scan (Dublín, Irlanda) e hidróxido amónico y acetona grado HPLC de Merck (Darmstadt, Alemania). Para los tampones de separación y análisis de proteínas se emplearon bicarbonato amónico y SDS de Fluka, ácido fórmico de Riedel-de Haën, hidróxido sódico de Panreac (Barcelona, España), isopropanol de Scharlau (Barcelona, España) y acetonitrilo de Lab-Scan. El agua empleada se desionizó mediante un sistema Milli-Q de Millipore (Bedford, MA, EEUU). El copolímero poli-etilpirrolidinametacrilato-N, N-dimetilacrilamida (EPyM-DMA), se sintetizó en el laboratorio del Dr C. Elvira (Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros, Madrid, CSIC) (González y col., 2003).

**Muestras de maíz.** Las semillas de las variedades transgénicas de maíz PR33P67, Tietar Bt y Aristis Bt y las de sus correspondientes variedades isogénicas (PR33P66, Tietar y Aristis) fueron obtenidas a partir de plantas cultivadas en las mismas condiciones ambientales en la Estación Experimental Agrícola Mas Badía, en Tallada d'Empordà (Gerona, España). Las tres variedades transgénicas en estudio contienen el evento MON810 de la compañía Monsanto (St Louis, MO, EEUU). La modificación genética en el maíz transgénico Bt realizada por Monsanto consistió en la inserción del gen *CryIAb* de *B. thuringiensis*, que confiere resistencia al taladro, un lepidóptero que es una de las principales plagas del maíz. La preparación de las muestras a partir de las

semillas se realizó moliendo por separado las semillas transgénicas y las convencionales en dos molinillos distintos. La presencia o ausencia de secuencias de ADN transgénico en las muestras se confirmó mediante su análisis empleando un procedimiento analítico desarrollado en nuestro laboratorio (García-Cañas y col., 2002b; García-Cañas y col., 2008b).

**Muestra patrón de zeínas.** Se empleó un patrón de zeína (Zeína F4000, 92% de pureza) de Freeman Industries LLC (Tuckahoe, NY, EEUU).

### 3.3.2. Extracción de las zeínas de maíz

El procedimiento de extracción de las zeínas a partir de las muestras de maíz se basó en el trabajo de Bean (Bean y col., 2000), con algunas modificaciones. Se mezclaron 50 mg de la harina de maíz con 1 mL del tampón de extracción (acetonitrilo:2-mercaptoetanol:agua; 60:5:35, v/v/v), y posteriormente, se añadió hidróxido amónico hasta una concentración final de 120 mM. Las muestras se mantuvieron en agitación durante 5 min y se centrifugaron durante 1 min a 3500 rpm a temperatura ambiente. Se recogió la fase hidroorgánica superior que contiene las proteínas. La incubación de la harina de maíz con el tampón y los pasos posteriores se repitieron tres veces en cada extracción. Las fases hidroorgánicas se mezclaron y, a continuación, se llevó a cabo la precipitación de las proteínas. Para ello, se añadieron ocho volúmenes de acetona y se centrifugaron durante 1 min a 3500 rpm. Tras la centrifugación, el sobrenadante se descartó y el precipitado se secó y redisolvió en 200  $\mu$ L del electrolito de separación (acetonitrilo:ácido fórmico:agua; 60:2:38, v/v/v). Las muestras se almacenaron a -20°C hasta su uso.

### 3.3.3. Análisis de los extractos de proteínas

Los extractos de proteínas de maíz transgénico y convencional se analizaron mediante dos métodos distintos, uno mediante CE-ESI-IT-MS y otro mediante CE-ESI-TOF-MS, como se detalla a continuación:

**CE-ESI-IT-MS:** se empleó un equipo de electroforesis capilar P/ACE 5010 (Beckman Coulter, Fullerton, CA, EEUU) provisto de un detector ultravioleta de filtros, controlado por un PC y el software System GOLD. Este equipo se acopló a un espectrómetro de masas de trampa de iones Esquire 2000 (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania) mediante una interfase ESI ortogonal con flujo adicional, modelo G1607A (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EEUU). El espectrómetro de masas estuvo controlado por un PC con el software Esquire NT de Bruker Daltonics. El contacto eléctrico en la aguja del electrospray se estableció mediante el uso de un líquido adicional (isopropanol:agua; 50:50, v/v) impulsado por una bomba de jeringa modelo 74900-00-05 de Cole Parmer (Vernon Hills, IL, EEUU). El calibrado del equipo se realizó con una mezcla de acetonitrilo, mezcla calibrante ES tuning mix G2421 (Agilent Technologies) y agua (85:10:5, v/v/v).

Para llevar a cabo el análisis del extracto de zeínas mediante CE-ESI-IT-MS se emplearon capilares con un diámetro interno de 50  $\mu\text{m}$  y una longitud de 90 cm hasta el detector. Las muestras fueron inyectadas en el extremo catódico del capilar por presión de  $\text{N}_2$  a 0.5 psi durante 45 segundos, y la separación se llevó a cabo aplicando un voltaje de -20 kV (polaridad inversa). El tampón de separación estaba compuesto por acetonitrilo:isopropanol:ácido fórmico:agua (40:20:2:38, v/v/v/v). Para evitar los problemas típicos de adsorción de las proteínas a la pared interna del capilar, se empleó un procedimiento físico para recubrir la pared del capilar con el copolímero catiónico EPyM-DMA. El procedimiento consistió en la siguiente rutina de lavado entre análisis: 1) 0.1 M NaOH durante 1 min, 2) 1% (m/v) de SDS durante 1 min, 3) solución acuosa con 0.1 mg/mL de EPyM-DMA durante 2 min y 4) tampón de separación durante 5 min. Para evitar que el polímero o el SDS entraran y ensuciaran el espectrómetro de masas durante los lavados, se detuvo la nebulización durante este procedimiento.

En la interfase, se estableció una presión de  $\text{N}_2$  de nebulización del electrospray de 0.3 bar, un caudal y temperatura de gas de secado de 4 L/min y 120°C, y un caudal del líquido adicional (isopropanol: agua; 50:50, v/v) de 0.29 mL/h. Se variaron los voltajes del octopolo de radiofrecuencia (Rf), del skimer 1 (skim1), de la salida del capilar de vidrio y de la entrada de la trampa para mejorar la sensibilidad. Se trabajó en el modo de ionización positivo y se estableció el análisis en un rango de masas de 1200 a 2200 m/z (siendo 2200 el valor m/z máximo que permite utilizar el IT-MS).

**CE-ESI-TOF-MS:** se empleó un equipo de electroforesis capilar P/ACE 5500 (Beckman Instruments) acoplado a un espectrómetro de masas microTOF (Bruker Daltonics) mediante una interfase electrospray con flujo adicional G1607A (Agilent Technologies). El circuito eléctrico se cerró mediante un líquido adicional impulsado por una bomba de jeringa de Cole Parmer. El espectrómetro de masas microTOF estuvo controlado por un PC y el Software MicroTOF Control 1.1 (Bruker Daltonics).

En los análisis de los extractos de las zeínas de maíz mediante CE-ESI-TOF-MS, se empleó un capilar con un diámetro interno de 50  $\mu\text{m}$  y una longitud de 90 cm hasta el detector. Estos análisis se efectuaron en las mismas condiciones de separación y con los mismos parámetros de la interfase que los establecidos en los análisis por CE-ESI-IT-MS. Se analizó un intervalo de masas de 800 a 3000  $m/z$  (siendo 3000 el valor  $m/z$  máximo que permite utilizar el TOF-MS). Los parámetros correspondientes a los voltajes del analizador (Hexapolo Rf y voltaje a la salida del capilar de vidrio), así como los tiempos de transferencia y almacenamiento de los iones se optimizaron con el fin de obtener la mayor sensibilidad posible. Se realizó un calibrado entre cada análisis empleando ES tuning mix G2421 (Agilent Technologies).

#### **3.3.4. Tratamiento de los resultados**

Se empleó el programa DataAnalysis 3.3 (Bruker Daltonics) y las diferentes herramientas que contiene (por ejemplo, la aplicación Charge State Ruler) para la determinación de la masa molecular de las proteínas a partir de los valores  $m/z$  de los iones más representativos de las mismas.

### **3.4. Resultados y discusión**

#### **3.4.1. Extracción de la fracción de zeínas de semillas de maíz**

Las proteínas del endospermo del maíz se pueden dividir en cuatro fracciones: albúminas (3.2%), globulinas (1.5%), glutelinas (35.1%) y prolaminas (47.2%) (Landry y col., 1982). La diferencia de solubilidad entre estas fracciones proteicas permite su

extracción por separado. Las albúminas son proteínas hidrosolubles, mientras que las globulinas son solubles en disoluciones acuosas salinas. En cambio, las glutelinas son solubles en medios básicos o ácidos, y las prolaminas son solubles en medios alcohólicos. Las zeínas son las proteínas mayoritarias en la fracción de prolaminas. Tienen un peso molecular entre 20000 y 40000 Da. La función de estas proteínas es almacenar nitrógeno para el desarrollo de la semilla. Las zeínas son relativamente fáciles de extraer, debido a su solubilidad en alcohol. Sin embargo los extractos están formados por diversas proteínas que tienden a interaccionar unas con otras (Kim y col., 2002). Se seleccionó la fracción correspondiente a las zeínas para el estudio comparativo de los dos sistemas de CE-ESI-MS debido a que representan la fracción mayoritaria en la semilla de maíz.

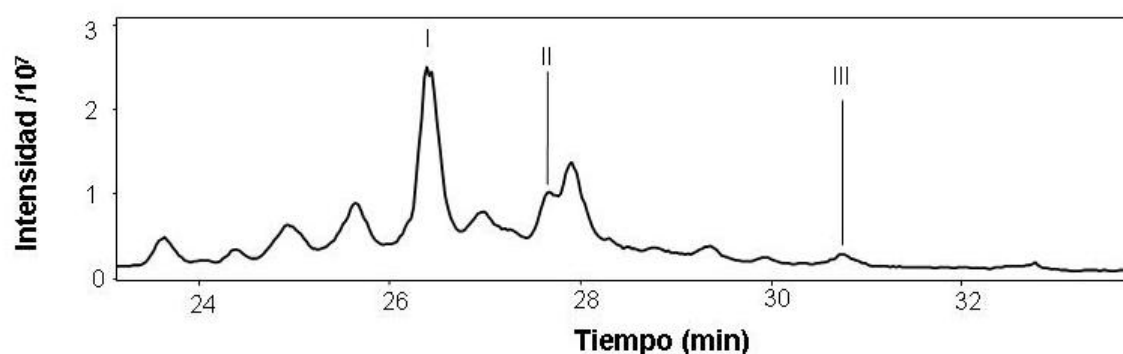
El método de extracción empleado se basó en el método desarrollado por Bean (Bean y col., 2000) tal como se ha descrito en Materiales y Métodos. Este método permite la extracción de las prolaminas intactas.

#### **3.4.2. Optimización de los parámetros instrumentales en CE-ESI-IT-MS y CE-ESI-TOF-MS**

En la interfase ESI, las proteínas se ionizan con múltiples cargas distintas. El espectro de masas de una proteína se caracteriza por una distribución de iones, cada uno de los cuales tiene una  $m/z$  que corresponde a un estado de carga distinto de las proteínas intactas. Esta distribución de cargas depende principalmente de la disponibilidad espacial de los aminoácidos básicos y del extremo N-terminal y, por tanto, de la estructura terciaria de la proteína (Loo y col., 1990). Los parámetros instrumentales de la interfase y del detector de masas también determinan la distribución de cargas y, por tanto, el espectro de masas de las proteínas (Vaidyanathan y col., 2004).

Inicialmente, se investigó el efecto de una serie de parámetros instrumentales en la señal proporcionada por los dos sistemas analíticos en estudio, CE-ESI-IT-MS y CE-ESI-TOF-MS. Para ello, se efectuó la extracción de la fracción correspondiente a las zeínas a partir de una muestra de maíz molida de la variedad convencional Aristis y seguidamente, se analizó mediante CE-ESI-IT-MS y CE-ESI-TOF-MS. A partir de los

electroferogramas obtenidos en el análisis de los extractos proteicos de la variedad Aristis, mediante los dos acoplamientos, se seleccionaron tres picos (picos I, II y III en la Figura 3.1). Se tomaron estos picos de referencia ya que aparecían en ambos análisis con lo que permitían llevar a cabo el posterior estudio comparativo entre ambos sistemas de detección. En la Figura 3.1, el pico I corresponde a la comigración de dos proteínas de masas 23360 y 24085 Da, mientras que los picos II y III corresponden a proteínas puras de masas 23366 y 27186 Da, respectivamente. Estas masas se determinaron mediante la aplicación Charge State Ruler del DataAnalysis 3.3.



**Figura 3.1.** Electroferograma de iones totales (TIE) de una mezcla de zeínas obtenido mediante CE-ESI-IT-MS. Los picos I, II y III se emplean para realizar los ajustes del espectrómetro de masas. Las condiciones en separación fueron: Capilar de sílice fundida, 50  $\mu\text{m}$  d.i., longitud 90 cm y con recubrimiento interno catiónico EPyM:DMA. Voltaje de separación: -20kV; Tampón de separación ACN:isopropanol:ácido fórmico:agua, (40:20:2:38, v/v/v/v), inyección por presión de  $\text{N}_2$  a 0.5 psi durante 45 s. Líquido adicional: MeOH:H<sub>2</sub>O (50:50, v/v) a 0.24 mL/h. Temperatura del gas de secado: 120°C.

A continuación, se estudió el efecto de los parámetros de detección mediante espectrometría de masas en la detección de las zeínas, con el fin de mejorar la sensibilidad del análisis. Entre estos parámetros se incluyen los voltajes a la salida del capilar de vidrio en ambos equipos, el voltaje en el skimer 1, en el octopolo y en la trampa en CE-ESI-IT-MS y el voltaje del hexapolo de radiofrecuencia y los tiempos de transferencia y de almacenamiento en CE-ESI-TOF-MS. La optimización se efectuó mediante la comparación de los espectros de masas de los picos I, II y III en términos de la intensidad de los iones de los picos II y III, la masa molecular relativa medida experimentalmente ( $M_r$ ) en el pico III y el ratio de intensidad 23360/24086 en el pico I, medido en el electroferograma de iones extraídos (EIE) de cada proteína. En las Tablas 3.1 y 3.2 se recogen los valores de los parámetros instrumentales investigados, junto con las intensidades y las masas obtenidas empleando ambos detectores, la trampa de iones (Tabla 3.1) y el tiempo de vuelo (Tabla 3.2).

**Tabla 3.1.** Efecto de los parámetros instrumentales en los espectros de masas de los 3 picos tomados como referencia en el análisis por CE-ESI-IT-MS.

Exp. <sup>1</sup>	Parámetros instrumentales				Pico II		Pico III		Pico I	
	sk1 <sup>2</sup> /V	V salida cap <sup>3</sup> /V	Octop <sup>4</sup> /V	Trpa <sup>5</sup> /V	m/z <sup>6</sup>	I <sup>7</sup>	m/z	I	Mr <sup>8</sup>	I <sub>23360</sub> /I <sub>24085</sub> <sup>9</sup>
1	61.3	88.3	3.04	65.3	1558.2	27322	1700.0	4716	27184.6	1.76
2	42.3	76.7	3.04	65.3	1375.1	7948	2091.8	508	n/a	1.60
3	47.7	79.6	3.04	58.6	1230.5	14589	1511.1	1524	27181.6	2.80
4	42.3	76.7	3.04	85.7	2124.6	9345	n/a	n/a	n/a	1.49
5	47.7	79.6	3.04	76.4	2124.5	26795	1600.2	846	n/a	2.09
6	36.2	73.8	3.04	76.4	2124.7	5076	1943.0	2047	27183.7	1.29
7	68.9	68.9	3.04	76.4	2124.9	13701	1942.9	1228	27184.8	1.80
<b>8 (A)</b>	<b>68.9</b>	<b>68.9</b>	<b>3.04</b>	<b>67.5</b>	<b>1797.9</b>	<b>11402</b>	<b>1600.3</b>	<b>2153</b>	<b>27187.0</b>	<b>1.46</b>
<b>9 (B)</b>	<b>75.8</b>	<b>99.8</b>	<b>3.04</b>	<b>67.5</b>	<b>1947.8</b>	<b>13081</b>	<b>1600.3</b>	<b>2532</b>	<b>27188.0</b>	<b>1.88</b>
10	75.8	99.8	3.04	58.6	1797.9	7526	1600.1	774	27185.2	1.22
11	82.2	82.2	3.04	67.5	1669.7	9113	1700.2	1290	27186.9	1.91
12	49.4	80.5	2.82	48.3	1375.2	7130	n/a	n/a	n/a	1.40
<b>13 (C)</b>	<b>55.6</b>	<b>84.4</b>	<b>2.94</b>	<b>56.8</b>	<b>1558.2</b>	<b>15201</b>	<b>1511.3</b>	<b>2761</b>	<b>27185.1</b>	<b>1.88</b>
14	61.3	88.3	3.04	65.3	1558.2	21603	1600.1	3496	27184.4	1.30
15	66.4	92.1	3.13	73.8	1947.9	28855	1600.0	2930	27183.8	1.42
16	71.3	96	3.22	82.3	1947.6	14024	1699.9	1594	27182.9	1.93
<b>17 (D)</b>	<b>75.8</b>	<b>99.8</b>	<b>3.3</b>	<b>90.8</b>	<b>2124.7</b>	<b>17743</b>	<b>1942.9</b>	<b>1419</b>	<b>27186.3</b>	<b>1.56</b>
18	80.1	103.7	3.38	99.3	2124.8	19732	2092.1	946	27184.2	1.27
19	84.2	107.6	3.45	107.8	2124.6	9086	n/a	n/a	n/a	1.80

- 1- N° Experimento.  
 2- Voltaje en el skimmer 1.  
 3- Voltaje a la salida del capilar de vidrio.  
 4- Voltaje en el octopolo.  
 5- Voltaje en la trampa.  
 6- Masa/carga del ión más intenso.  
 7- Intensidad del ión.  
 8- Masa molecular relativa.  
 9- Relación de las intensidades de los EIE de las proteínas que comigran en el pico I.  
 n/a- en esas condiciones no se detectó ninguna proteína.

Las Figuras 3.2 y 3.3 muestran los espectros de masas obtenidos de los picos I, II y III (Figura 3.1) en las condiciones experimentales, que aparecen indicadas como A, B, C y D en las Tablas 3.1 y 3.2, de los análisis por CE-ESI-IT-MS y CE-ESI-TOF-MS, respectivamente.

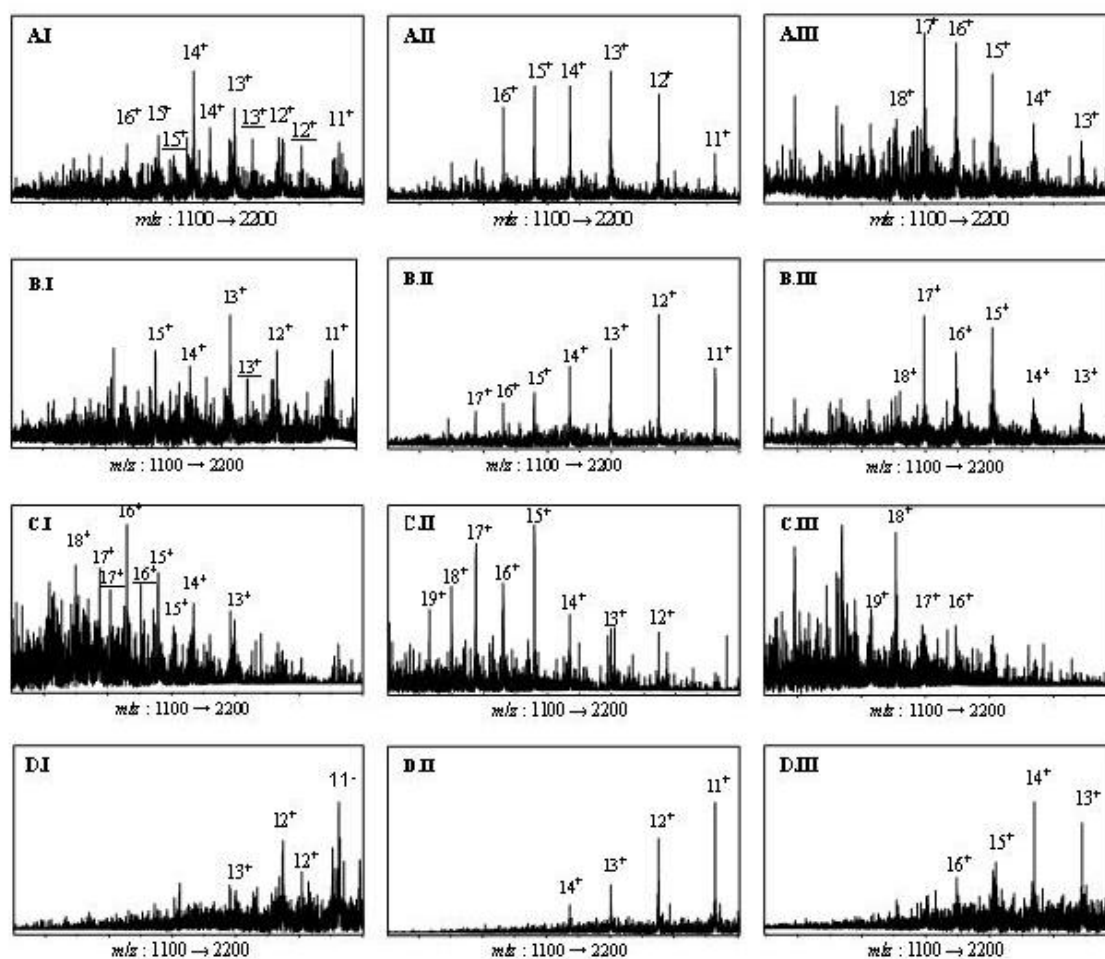


Tabla 3.2. Efecto de los parámetros instrumentales en los espectros de masas de los 3 picos tomados como referencia en el análisis por CE-ESI-TOF-MS.

Exp <sup>1</sup>	Parámetros instrumentales				Pico II		Pico III		Pico I	
	Hexap Rf <sup>2</sup> /V	V salida cap <sup>3</sup> /V	t de trans <sup>4</sup> /μs	t de almac <sup>5</sup> /μs	m/z <sup>6</sup>	I <sup>7</sup>	m/z	I	M <sub>r</sub> <sup>8</sup>	I <sub>23360</sub> /I <sub>24085</sub> <sup>9</sup>
1	700	220	60	28	1559.2	514	1347.9	386	n/a	1.23
2	700	80	100	28	1306.6	369	1022.7	290	n/a	n/a
3	300	220	100	28	1404.8	333	n/a	n/a	n/a	n/a
<b>4 (A)</b>	<b>700</b>	<b>220</b>	<b>100</b>	<b>28</b>	<b>2596.1</b>	<b>846</b>	<b>1813.5</b>	<b>385</b>	<b>27187.88</b>	<b>2.06</b>
5	800	220	110	30	1669.4	546	2055.1	226	27180.46	1.60
6	300	120	50	7	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
7	800	250	100	28	1644.1	138	1521.9	145	27183.99	1.45
<b>8 (B)</b>	<b>800</b>	<b>250</b>	<b>110</b>	<b>30</b>	<b>1671.2</b>	<b>230</b>	<b>n/a</b>	<b>n/a</b>	<b>n/a</b>	<b>1.41</b>
9	800	250	110	30	2596.5	83	1903.2	22	n/a	1.43
10	800	250	110	40	2716.8	46	2314.7	38	n/a	1.16
11	800	250	80	27	2596.1	138	1429.6	47	27182.22	1.51
<b>12 (C)</b>	<b>800</b>	<b>300</b>	<b>80</b>	<b>27</b>	<b>2596.4</b>	<b>142</b>	<b>1602.9</b>	<b>50</b>	<b>n/a</b>	<b>1.45</b>
13	800	300	50	15	1308.7	151	1337.4	64	27183.43	n/a
14	700	220	100	28	2596.4	436	n/a	n/a	n/a	0.89
15	700	120	100	28	1373.2	407	1367.9	222	n/a	1.34
16	700	300	100	28	2596.6	882	n/a	n/a	n/a	1.48
17	700	220	50	28	1669.6	886	n/a	n/a	n/a	1.97
<b>18 (D)</b>	<b>700</b>	<b>220</b>	<b>100</b>	<b>7</b>	<b>1558.1</b>	<b>1244</b>	<b>1348</b>	<b>276</b>	<b>n/a</b>	<b>1.01</b>
19	300	220	100	28	2596.5	550	1348	308	27183.48	0.87

- 1- N° Experimento
  - 2- Voltaje en el hexapolo de radiofrecuencia
  - 3- Voltaje a la salida del capilar de vidrio
  - 4- Tiempo de transferencia de los iones
  - 5- Tiempo de almacenamiento de los iones
  - 6- Masa/carga del ión más intenso
  - 7- Intensidad del ión
  - 8- Masa molecular relativa
  - 9- Relación de las intensidades de los EIE de las proteínas que comigran en el pico I.
- n/a- en esas condiciones no se detectó ninguna proteína.

En la Tabla 3.1 y Figura 3.2 se puede observar que en el análisis por CE-ESI-IT-MS de la muestra, los iones más intensos varían considerablemente con todos los parámetros instrumentales estudiados, y que modificando estos, es posible controlar la intensidad de los iones a lo largo de la escala de m/z. Por ejemplo, en los espectros de la Figura 3.2, CI, CII y CIII, correspondiente al experimento 13 (condición C, Tabla 3.1), las máximas intensidades de iones se encuentran alrededor de 1300 m/z mientras que en los espectros de la Figura 3.2, DI, DII y DIII, correspondiente al experimento 17 (condición D, Tabla 3.1), los valores se sitúan alrededor de 2000 m/z.

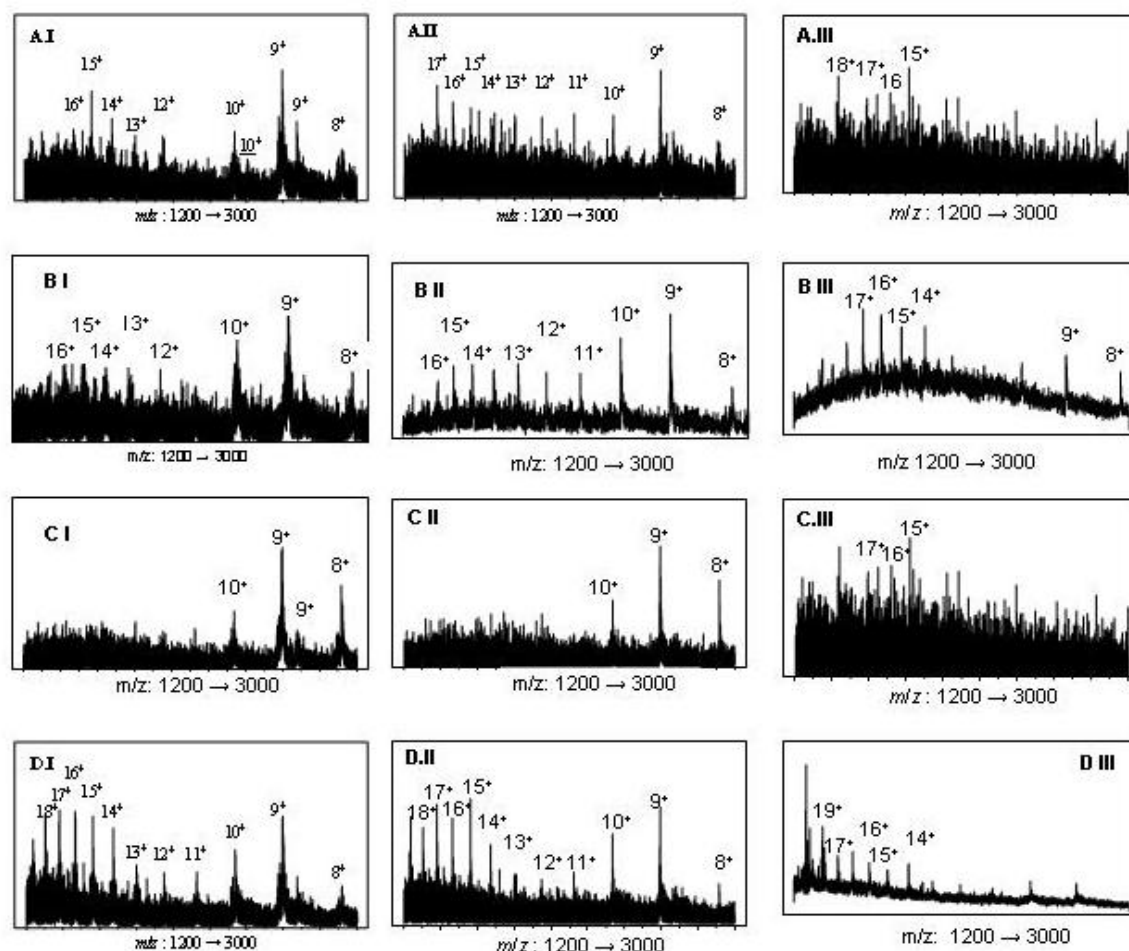


**Figura 3.2.** Espectros de masa obtenidos mediante CE-ESI-IT-MS de los picos I, II y III (Figura 3.1) en las condiciones A, B, C y D (Tabla 3.1). El eje X, como se indica, corresponde al intervalo de valores de  $m/z$  desde 1100 a 2200. Eje Y: unidades arbitrarias de intensidad. El resto de condiciones fueron idénticas a las de la Figura 3.1.

Asimismo, se observó que los parámetros instrumentales también influyeron en el perfil de la distribución de las proteínas. Este perfil puede ser gaussiano (Figura 3.2 BII) o tener una distribución más lineal (Figura 3.2 AII). Además, no todas las proteínas tienen el mismo comportamiento en función de los parámetros instrumentales (por ejemplo, la proteína del pico III presenta una distribución distinta en las Figuras 3.2 AIII y 3.2 BIII). Por tanto se puede concluir que, mediante la trampa de iones se pueden detectar unas proteínas u otras dependiendo de las condiciones experimentales empleadas.

Como se puede observar en los resultados presentados en la Tabla 3.1, existe una variación importante entre las relaciones de la intensidad en los EIE de las proteínas que comigran en el pico I (desde valores de 1.22 a 2.80, ver última columna en Tabla 3.1). Sin embargo, como cabía esperar, la determinación de la masa molecular no varió en las

distintas condiciones experimentales ensayadas. La desviación estándar relativa para la masa molecular ( $M_r$ ) es menor de 1.8 para una media de 27184.9 (RSD,  $n=14$ ,  $< 0.01\%$ ). Por otro lado, se llevó a cabo un estudio de reproducibilidad de la intensidad en las condiciones 1 y 14 (Tabla 3.2), en el que se obtuvieron coeficientes de variación para las intensidades inferiores al 25%.



**Figura 3.3.** Espectros de masa obtenidos mediante CE-ESI-TOF-MS de los picos I, II y III de la Figura 3.1, en las condiciones A, B, C y D (ver Tabla 3.2). El eje X, como se indica, corresponde al intervalo de valores de  $m/z$  desde 1200 a 3000. Eje Y: unidades arbitrarias de intensidad. El resto de condiciones fueron idénticas a las de la Figura 3.1.

De los experimentos realizados mediante CE-ESI-TOF-MS se obtuvieron conclusiones similares, especialmente a valores bajos de  $m/z$  ( $<2000$ ), como puede observarse en la Tabla 3.2 y Figura 3.3. Sin embargo a valores altos de  $m/z$ , los valores de la intensidad de los iones y  $M_r$  fueron muy similares en las distintas condiciones experimentales. Por tanto se concluye que mediante el analizador de tiempo de vuelo, se pueden detectar las mismas proteínas independientemente de estas condiciones experimentales. No obstante, dado que el analizador de trampa de iones (modelo Esquire 2000) no permite

el escaneo de valores superiores a 2200  $m/z$  no fue posible comparar la respuesta en este intervalo, y por lo tanto, no se pudo determinar si esta ausencia de variación de intensidad de los iones con los parámetros instrumentales a  $m/z$  altas se debe a las diferencias entre los equipos o a las propiedades intrínsecas de las proteínas.

Como se ha mencionado anteriormente, en función de las condiciones experimentales utilizadas, se pueden detectar proteínas distintas en CE-ESI-IT-MS. Esto se ilustra en la Tabla 3.3, en la que se recogen los resultados obtenidos del análisis de las proteínas de una muestra de maíz de la variedad Aristis en tres condiciones experimentales distintas en CE-ESI-IT-MS y una en CE-ESI-TOF-MS. Así por ejemplo, en la condición experimental C (Tabla 3.1), solo se encuentran los valores de las proteínas entre 23300 y 24200 Da, mientras que en las condiciones experimentales B y D (Tabla 3.1), se detectaron proteínas con valores de 17000 y 27000, respectivamente. Por otro lado, la condición experimental ensayada (A, Tabla 3.2) en el análisis por CE-ESI-TOF-MS no tuvo un efecto tan crítico, ya que se pudieron identificar la mayoría de las proteínas. Como muestran los resultados, los valores de la  $M_r$  de las proteínas no dependen de los parámetros instrumentales y además muchos de ellos coinciden con los encontrados en un trabajo anterior (Erny y col., 2007). Sin embargo, nuevamente se concluye que las proteínas que se detectan sí dependen de estas condiciones experimentales en la trampa de iones y no tanto en el tiempo de vuelo (Tabla 3.3).

**Tabla 3.3.** Peso molecular de las proteínas determinadas en los electroferogramas obtenidos mediante CE-ESI-IT-MS y CE-ESI-TOF-MS.

Pico	<b>M<sub>r</sub></b>				Bibliografía <sup>c</sup>
	IT (Exp B) <sup>a</sup>	IT (Exp C) <sup>a</sup>	IT (Exp D) <sup>a</sup>	TOF (Exp A) <sup>b</sup>	
1	24425.3		24426.9	24427.4	
2	26816.1			26831.1	
3	23363.6, 23426.9, 23233.5, 24088.0	23365.2 24088.2	23361.9 23232.8, 24089.9	23140.2, 23358.5 24085.7, 23216.3 23365.3, 23436.4	24087, 23359
4	26925.0, 26763.5			26758.8, 26922.8 26383.2	26359, 26701 26751, 26923
5	23360.0, 23421.3	23362.2	23362.5, 23415.2	23360.3	23359
6	23995.2, 24137.5	24001.1, 24140.5	23996.0, 24136.9 23267.3, 23364.9	24137.3, 23266.8, 23993.6,	24706
7	23752.0			26751.7	26751
8					
9	26632.0		26635.1	26630.6	
10	17145.2		17146.0, 17206.7 17267.8	26817, 17244.1, 17219.7, 17163.1 17182.1	17458, 17663
11	27191.4, 24559.7		27186.4, 24560.9	27185.5, 24558.8	27128
12	27127.0		27137.1	27128.6	27128
13			17751.9, 17813.6 17877.0		
14			17425.5, 17325.8		

a- Condiciones indicadas en la Tabla 3.1

b- Condiciones indicadas en la Tabla 3.2

c- De Erny y col., 2007

A continuación, se estudió el efecto de la concentración de las zeínas en el espectro de masas. Para ello se prepararon muestras patrón de zeína, disolviéndose en acetonitrilo:agua:ácido fórmico:amoníaco 25% (60:36:2:2, v/v/v/v), a distintas concentraciones. Posteriormente se analizaron las distintas concentraciones de la mezcla patrón mediante CE-ESI-IT-MS (intervalo de concentraciones de 0.05 a 10 mg/mL) y CE-ESI-TOF-MS (intervalo de 0.5 a 7.5 mg/mL). Se seleccionaron las condiciones experimentales 9 (Tabla 3.1) y 4 (Tabla 3.2) para CE-ESI-IT-MS y CE-ESI-TOF-MS, respectivamente. Aunque cabría esperar que las concentraciones altas dieran relaciones señal-ruido mayores, los resultados mostraron que la concentración de proteína, en los intervalos ensayados, no tuvo un efecto significativo en los espectros de masas. Esto puede indicar que la mayor parte del ruido se debe a las proteínas que están a baja concentración y que comigran, o en menor medida, a posibles fragmentaciones de los

iones principales. Tampoco puede descartarse el efecto adicional sobre el ruido procedente de otros iones de menor tamaño existentes en la muestra, y cuya concentración aumentaría al aumentar la concentración de la muestra a analizar.

La concentración de cada una de las proteínas se estimó a partir del porcentaje del área de su EIE respecto al área total del pico, medido en el electroferograma de iones totales. El área del EIE se calculó de dos modos diferentes, bien utilizando los EIE obtenidos a partir del ión más abundante o utilizando los seis iones más abundantes. Utilizando el primer método a partir de los resultados de CE-ESI-IT-MS, el coeficiente de variación (CV) que se obtuvo para el área fue del 30% (n=12, análisis por triplicado de 4 proteínas), mientras que empleando el segundo método, se obtuvo un CV de 11% (n=12). En el análisis por CE-ESI-TOF-MS se obtuvieron resultados semejantes, en concreto, 20% (n=12) y 11% (n=12), respectivamente.

Con el fin de calcular el límite de detección (LOD, para una relación señal/ruido de 3) se inyectó por triplicado 1 mg/mL de una muestra patrón y se calculó la relación señal/ruido de los EIE de las proteínas obtenidas en los tres picos. Como se puede deducir de los valores de LOD recogidos en la Tabla 3.4, se obtuvieron resultados muy similares utilizando ambos equipos.

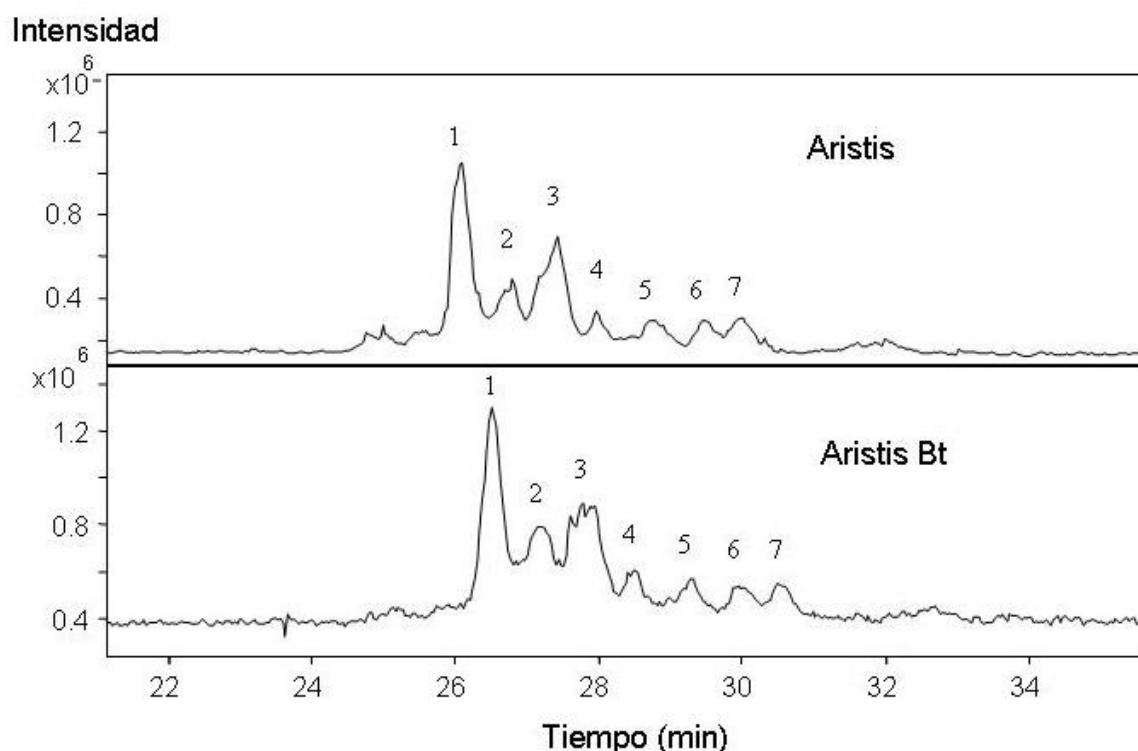
**Tabla 3.4.** Límite de detección (LOD) de las cuatro zeínas seleccionadas analizadas por CE-ESI-IT-MS y CE-ESI-TOF-MS.

Pico	CE-ESI-IT-MS		CE-ESI-TOF-MS	
	M <sub>r</sub>	LOD $\mu\text{g mL}^{-1}$	M <sub>r</sub>	LOD $\mu\text{g mL}^{-1}$
I	23360	$3.4 \pm 0.9$	23357	$4.5 \pm 2.1$
	24085	$2.1 \pm 1.2$	24087	$3.4 \pm 0.5$
II	23366	$1.8 \pm 0.4$	23361	$5.4 \pm 1.7$
III	27186	$0.32 \pm 0.10$	27183	n/a

#### **3.4.3. Análisis de la fracción proteica, correspondiente a las zeínas, en extractos de maíz convencional y transgénico**

Finalmente y con el objetivo de identificar posibles diferencias inesperadas en el perfil proteico entre muestras de maíz convencional y transgénico, se aplicaron los dos métodos analíticos desarrollados (CE-ESI-IT-MS y CE-ESI-TOF-MS) al análisis de las

zeínas de los extractos de maíz convencional y transgénico. Con este fin, se realizaron extracciones de las zeínas de tres variedades transgénicas de maíz (Aristis Bt, Tietar Bt y PR33P67) y sus correspondientes variedades de maíz sin la modificación genética (Aristis, Tietar y PR33P66). Para llevar a cabo estos análisis se empleó la condición experimental 9 (Tabla 3.1) en el caso del análisis por CE-ESI-IT-MS y la condición 4 (Tabla 3.2) en el caso del análisis por CE-ESI-TOF-MS. En la Figura 3.4 se muestran los electroferogramas de iones totales de la variedad Aristis de maíz transgénico MON810 (Aristis Bt) y su correspondiente variedad convencional isogénica (Aristis) empleando el espectrómetro de masas de tiempo de vuelo (CE-ESI-TOF-MS). El análisis de los espectros de masas no mostró diferencias entre las proteínas detectadas en las variedades transgénicas y convencionales de maíz. Tampoco se observaron diferencias en el perfil de proteínas entre las tres variedades de maíz analizadas.



**Figura 3.4.** Electroferograma de iones totales de una variedad de maíz transgénico (Aristis Bt) y su correspondiente variedad isogénica (Aristis) mediante CE-ESI-TOF-MS empleando las condiciones experimentales descritas en la fila 4 de la Tabla 3.2.

### **3.5. Conclusiones**

El estudio de la fracción proteica mediante CE-ESI-IT-MS y CE-ESI-TOF-MS muestra que:

- a. El método de análisis CE-ESI-TOF-MS permite detectar un mayor número de proteínas que el método CE-ESI-IT-MS.
- b. Ambos procedimientos analíticos presentan límites de detección y reproducibilidad similares.
- c. La variación de los parámetros instrumentales afecta más a la detección de las proteínas mediante CE-ESI-IT-MS que mediante CE-ESI-TOF-MS.
- d. No se han encontrado diferencias significativas entre los perfiles proteicos, correspondientes a las zeínas, en los extractos de maíz convencional y transgénico.



**CAPÍTULO IV: Empleo de ciclodextrinas  
modificadas como selectores quirales en  
CE-LIF y CE-ESI-TOF-MS para el análisis  
quiral de aminoácidos en muestras de soja  
transgénica y convencional**



## **4. Empleo de ciclodextrinas modificadas como selectores quirales en CE-LIF y CE-ESI-TOF-MS para el análisis quiral de aminoácidos en muestras de soja transgénica y convencional**

### **4.1. Introducción**

Los compuestos quirales son aquellos que se pueden encontrar en la naturaleza con dos conformaciones espaciales distintas, denominadas enantiómeros. Un compuesto tiene dos enantiómeros cuando ambas conformaciones son imágenes especulares no superponibles entre sí. Un ejemplo característico de compuestos quirales son los aminoácidos, que presentan dos enantiómeros, el enantiómero L y el enantiómero D.

El análisis de compuestos quirales cuenta con un elevado número de aplicaciones en el área farmacéutica, clínica, ambiental y alimentaria (Simó y col., 2003; Hernández-Borges y col., 2005b; Erny y col., 2006). El análisis quiral es importante en la investigación de nuevos fármacos, ya que un compuesto puede presentar un enantiómero con la actividad biológica deseada, mientras que el otro enantiómero puede carecer de dicha actividad, o incluso puede tener un efecto perjudicial (Simó y col., 2010b). En la industria alimentaria, determinados procesos como la fermentación o la aplicación de tratamientos térmicos pueden llegar a modificar la relación enantiomérica de algunos analitos. Además, en algunos casos de adulteración fraudulenta de alimentos se adiciona la mezcla de enantiómeros de un determinado compuesto al ser la mezcla más barata que el enantiómero puro. Por tanto, el estudio de la composición enantiomérica de determinadas sustancias puede ser una herramienta muy útil para evaluar la calidad de algunos alimentos.

#### **4.1.1. Separación quiral en CE-MS**

La electroforesis capilar es una técnica muy útil para la separación y detección de compuestos quirales ya que proporciona eficacias elevadas, tiempos de análisis cortos y requiere cantidades pequeñas de electrolito de separación y muestra (Cifuentes, 2006). Además, su acoplamiento con el analizador de espectrometría de masas de tiempo de vuelo proporciona, como ventaja adicional, la detección de la masa exacta de los

analitos (Schmitt-Kopplin y col., 2003). Un ejemplo del empleo de CE-MS para el análisis quiral en alimentos es la detección de adulteraciones de zumos de naranja con aminoácidos sintéticos (Simó y col., 2005).

Sin embargo, mediante la electroforesis capilar en zona libre, no es posible la separación de los enantiómeros de una misma especie química debido a que presentan la misma forma, tamaño y carga, y por tanto la misma movilidad electroforética. Para alcanzar esta separación, uno de los procedimientos más utilizados es el empleo de los denominados selectores quirales. Los selectores quirales interaccionan estereoespecíficamente con los enantiómeros dando lugar a complejos con distinta velocidad de migración. Los selectores quirales más empleados son las ciclodextrinas (CD) (Simó y col., 2010b), que son oligosacáridos cíclicos formados por seis ( $\alpha$ -CD), siete ( $\beta$ -CD) u ocho ( $\gamma$ -CD) unidades de glucosa, y que forman un cono con una cavidad hidrófoba y una superficie externa hidrofílica. Un ejemplo de la utilización de CDs en electroforesis capilar es el análisis quiral de aminoácidos en variedades de maíz transgénico empleando  $\beta$ -ciclodextrina (Herrero y col., 2007).

Tanto las ciclodextrinas, como otras sustancias que se han utilizado tradicionalmente como selectores quirales en electroforesis capilar son compuestos poco volátiles, y por lo tanto, poco apropiados para su utilización en el acoplamiento CE-MS. La escasa volatilidad de las ciclodextrinas contribuye de forma significativa al incremento del ruido de fondo en la detección por espectrometría de masas, dando como resultado la contaminación de la fuente de ionización y del espectrómetro de masas con la correspondiente pérdida de sensibilidad. Por este motivo, es necesario el uso de diferentes estrategias, de tipo instrumental o metodológico para evitar este problema. Uno de los mecanismos utilizados para evitar la entrada de compuestos poco volátiles procedentes de la columna capilar dentro de la fuente de ionización, es el empleo de la técnica de llenado parcial del capilar (PFT) (Tanaka y col., 1995). En la técnica PFT, el capilar se llena con el electrolito de separación libre de compuestos poco volátiles, y a continuación, se llena un porcentaje al inicio del capilar (aproximadamente un 75%) con el electrolito que contiene el selector quiral. De este modo los analitos de interés se separan en la primera parte del capilar, y una vez separados migrarán hacia el espectrómetro de masas a lo largo de la zona final del capilar, libre de compuestos no volátiles. Sin embargo, esta técnica es difícil de optimizar y proporciona menor eficacia

y resolución que la separación quiral mediante electroforesis capilar (Petersson y col., 2003).

Otras estrategias empleadas para evitar la entrada de compuestos no volátiles en CE-MS son: a) el empleo de capilares de transferencia sin selector quiral entre el capilar de separación y el espectrómetro de masas; b) rellenos quirales utilizados como fase estacionaria en electrocromatografía; c) selectores quirales poliméricos compatibles con la formación del electrospray; y d) selectores quirales que migran en sentido opuesto a la salida del capilar. Sin embargo, estos procedimientos presentan inconvenientes tales como los problemas de optimización, el elevado precio, así como la escasa resolución y selectividad que proporcionan (Tanaka y col., 2000; Grard y col., 2001).

El empleo de ciclodextrinas modificadas (mCDs) en el electrolito de separación podría solucionar la pérdida de sensibilidad generalmente observada en el análisis quiral por CE-MS. Las mCDs, que tienen grupos ionizables, son un grupo de selectores quirales excelentes ya que mejoran las interacciones con el analito, favoreciendo la formación del complejo selector-analito, modificando su movilidad electroforética (incrementándola en el caso de las CDs catiónicas y por tanto, disminuyendo el tiempo de migración) y mejorando la resolución de la separación (Bonomo y col., 1991). De este modo, es posible utilizar el selector quiral en el tampón de separación a muy baja concentración, sin perjudicar la resolución de la separación (Cucinotta y col., 2001; Cucinotta y col., 2007) y previsiblemente sin afectar a la sensibilidad del análisis por CE-MS.

## 4.2. Objetivo y plan de trabajo

El objetivo de este trabajo es estudiar el empleo de tres ciclodextrinas modificadas como selectores quirales en el electrolito de separación para el análisis de aminoácidos quirales en muestras de soja transgénica y convencional mediante CE-ESI-TOF-MS.

Con el fin de lograr este objetivo se estableció el siguiente plan de trabajo:

### A. Selección de los selectores quirales.

**B.** Estudio comparativo de las ciclodextrinas seleccionadas para la separación quiral de aminoácidos patrón mediante CE-LIF y selección de la ciclodextrina modificada con mejores propiedades. La gran sensibilidad que proporciona CE-LIF se utilizará como referencia para determinar la sensibilidad obtenida en el análisis quiral por CE-MS.

**C.** Desarrollo de un método de análisis quiral de aminoácidos mediante CE-ESI-TOF-MS empleando la ciclodextrina seleccionada. Comparación entre los resultados obtenidos por CE-LIF y CE-ESI-TOF-MS.

**D.** Análisis de aminoácidos en muestras de vinagre, soja transgénica y su correspondiente variedad convencional mediante el método CE-ESI-TOF-MS desarrollado.

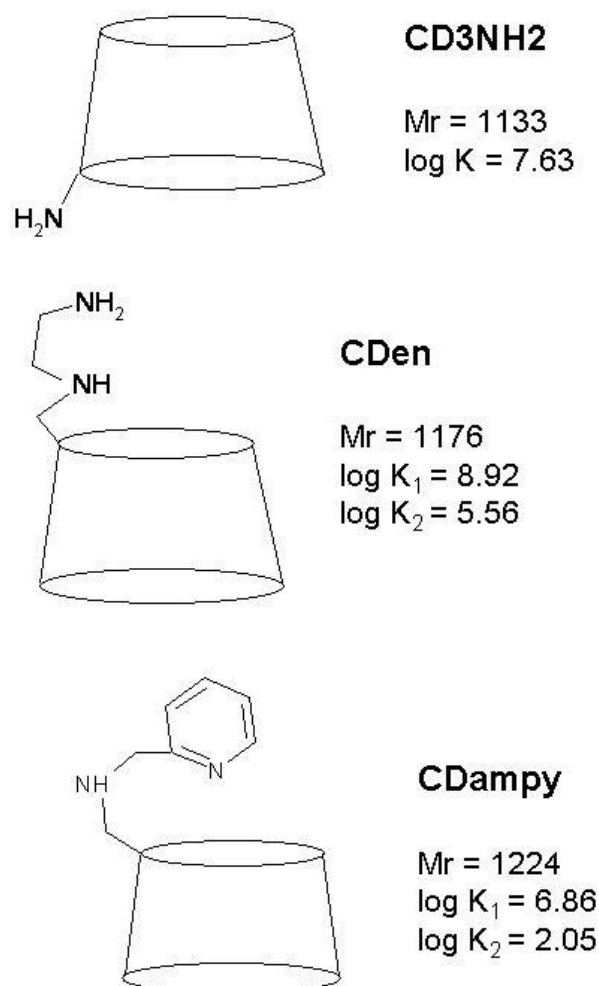
### **4.3. Materiales y métodos**

#### **4.3.1. Muestras y reactivos**

Los reactivos empleados en la extracción, la derivatización y el análisis de los aminoácidos de soja fueron adquiridos en distintas casas comerciales. Para la extracción y la derivatización, se emplearon: ácido tricloroacético (TCA) y acetona de Merck (Darmstadt, Alemania), hidróxido sódico de Panreac Química S.A. (Barcelona, España), tetraborato sódico de Acros Organics (Geel, Bélgica), isotiocianato de fluoresceína (FITC) de Fluka (Buchs, Suiza), y deoxicolato sódico de Sigma (Madrid, España). Para los tampones de separación y análisis de aminoácidos se emplearon: bicarbonato amónico de Fluka, ácido fórmico de Riedel-de Haën (Seelze, Alemania), acetato amónico de Panreac Química S.A., ácido acético de Acros Organics, hidróxido amónico de Merck, isopropanol de Scharlau (Barcelona, España) y metanol y acetonitrilo de Lab-Scan (Dublin, Irlanda). El agua empleada se desionizó mediante un sistema Milli-Q de Millipore (Bedford, MA, EEUU).

Se emplearon cinco tipos de ciclodextrinas como selectores quirales: dos variedades comerciales,  $\beta$ -CD y  $\gamma$ -CD de Fluka, y tres variedades modificadas, 6-deoxi-6-[1-(2-

amino)-etilamino]- $\beta$ -ciclodextrina (CDen), 6-deoxi-6-[N-(2-metilamino)-piridina]- $\beta$ -ciclodextrina (CDampy) y 3-monodeoxi-3-monoamino- $\beta$ -ciclodextrina (CD3NH<sub>2</sub>), que fueron sintetizadas por el grupo del Dr. V. Cucinotta (Universidad de Catania, Italia). La estructura de estas tres ciclodextrinas se puede ver en la Figura 4.1.



**Figura 4.1.** Esquema de las ciclodextrinas utilizadas en este trabajo, incluyendo su nombre abreviado (en negrita), su  $M_r$  y sus constantes de disociación ácido-base (log K).

**Muestras de soja.** Las semillas de la variedad transgénica de soja RR y de su correspondiente variedad isogénica fueron donadas por el Dr. G. Dinelli (Universidad de Bolonia, Italia). La modificación genética en la soja transgénica consistió en la inserción del gen EPSPS de la cepa CP4 de *A. tumefaciens* (CP4-EPSPS) que confiere resistencia al herbicida glifosato mediante la expresión de la enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (Monsanto, St Louis, MO, EEUU). Ambas variedades se cultivaron en las mismas condiciones ambientales, con el fin de minimizar

la variabilidad debida a posibles efectos de los factores ambientales que influyen en el crecimiento y desarrollo de las plantas. Las semillas fueron molidas por separado en molinillos distintos. La presencia o ausencia de las secuencias de ADN transgénico en las muestra se confirmó empleando un procedimiento analítico desarrollado en nuestro laboratorio (García-Cañas y col., 2002b; García-Cañas y col., 2008b).

**Muestras de vinagre.** Se empleó una muestra de vinagre balsámico de Módena comercial adquirido en un supermercado local como muestra de referencia rica en D-aminoácidos.

**Muestras patrón de aminoácidos.** Para llevar a cabo el análisis quiral de aminoácidos se prepararon muestras patrón a partir de los enantiómeros de arginina (D/L-Arg), asparagina (D/L-Asn), alanina (D/L-Ala), ácido aspártico (D/L-Asp) y ácido glutámico (D/L-Glu) de Sigma. La concentración de los aminoácidos patrón fue de: D- y L-Arg 103  $\mu$ M; D- y L-Asn, 135  $\mu$ M; D- y L-Ala, 401  $\mu$ M; D- y L-Glu, 121  $\mu$ M; D- y L-Asp, 134  $\mu$ M.

#### 4.3.2. Extracción y derivatización de los aminoácidos de soja y de vinagre

Con el fin de llevar a cabo la extracción de aminoácidos de las muestras de soja, se utilizó un método de extracción previamente optimizado en nuestro laboratorio (Carlavilla y col., 2006; Herrero y col., 2007). El procedimiento consistió en mezclar y homogeneizar la harina de soja (100 mg) con 1 mL de una disolución 0.37 M de TCA durante 2 min. Tras la adición de 0.2 mL de una disolución de 3.6 mM deoxicolato sódico, la mezcla se dejó en reposo durante 10 min y, a continuación, se centrifugó durante 15 min a 6000 rpm y temperatura ambiente. Posteriormente, el sobrenadante se transfirió a otro tubo y se centrifugó durante 1 h a 7500 rpm. Finalmente, el sobrenadante se transfirió a otro tubo para llevar a cabo la derivatización de los aminoácidos con FITC.

La muestra de vinagre utilizada se filtró para eliminar posibles precipitados y se derivatizó directamente (Carlavilla y col., 2006). El procedimiento de derivatización de aminoácidos con FITC consistió en mezclar 625  $\mu$ L de la muestra de vinagre filtrada o de las disoluciones patrón de aminoácidos con 675  $\mu$ L de agua y 7 mL de tetraborato de



sodio a pH 10. En el caso de las muestras de soja, se mezclaron 625  $\mu\text{L}$  de cada extracto con 675  $\mu\text{L}$  de agua y 1.5 mL de tetraborato sódico (pH 10). El pH de las mezclas resultantes se ajustó a un valor de 10 con hidróxido sódico y a un volumen de 10 mL con agua. Finalmente, se añadieron 50  $\mu\text{L}$  de una disolución de 3.75 mM FITC en acetona a 250  $\mu\text{L}$  de cada mezcla y se dejaron toda la noche a temperatura ambiente y en oscuridad.

#### **4.3.3. Condiciones de separación mediante CE-LIF**

La instrumentación CE-LIF empleada fue la misma que la descrita en el apartado 2.3.4 del Capítulo II. Para llevar a cabo los análisis quirales por CE-LIF, se utilizaron columnas capilares con un diámetro interno de 50  $\mu\text{m}$  y una longitud total de 60 cm (longitud efectiva de 50 cm). Las mezclas de aminoácidos patrón derivatizadas se inyectaron en el extremo anódico durante 5 segundos a 0.5 psi (aproximadamente 5 nL de inyección). El tampón de separación consistió en una disolución de 100 mM bicarbonato amónico a pH 8, junto con una concentración determinada de ciclodextrina. La separación se realizó a 20 kV. Los capilares fueron acondicionados previamente a su utilización mediante un lavado durante 30 min con 1 M NaOH, seguido de otro lavado durante 10 min con agua Milli-Q. El procedimiento de lavado entre análisis consistió en la siguiente rutina: 1) 0.1 M NaOH durante 1 min, 2) agua Milli Q durante 2 min, y 3) tampón de separación durante 5 min.

#### **4.3.4. Análisis de D/L-aminoácidos mediante CE-ESI-TOF-MS**

El análisis quiral de los aminoácidos en muestras de vinagre y soja se llevó a cabo mediante CE-ESI-TOF-MS empleando la misma instrumentación que la descrita en el apartado 3.3.3 del Capítulo III.

Se utilizó un capilar con un diámetro interno de 50  $\mu\text{m}$  y una longitud de 85 cm. Los extractos de aminoácidos fueron inyectados en el extremo anódico del capilar por presión de  $\text{N}_2$  a 0.5 psi durante 25 segundos (extractos de soja) o 10 segundos (vinagre). El tampón de separación consistió en una disolución de 50 mM bicarbonato amónico a

pH 8, con una concentración 0.5 mM de la ciclodextrina CD3NH<sub>2</sub>. La separación se llevó a cabo aplicando un voltaje de 30 kV. Se fijó una presión de N<sub>2</sub> de nebulización en el electrospray de 0.4 bar, un caudal y temperatura de gas de secado de 4 L/min y 80°C, y un caudal del líquido adicional (isopropanol: agua; 50:50, v/v) de 0.24 mL/h. Se estableció el análisis en un rango de masas de 200 a 2000 m/z. Se realizó un calibrado entre cada análisis empleando una mezcla de acetonitrilo, mezcla calibrante G2421 (Agilent Technologies) y agua en concentración 85:10:5 (v/v/v).

## 4.4. Resultados y discusión

### 4.4.1. Estudio comparativo de los selectores quirales

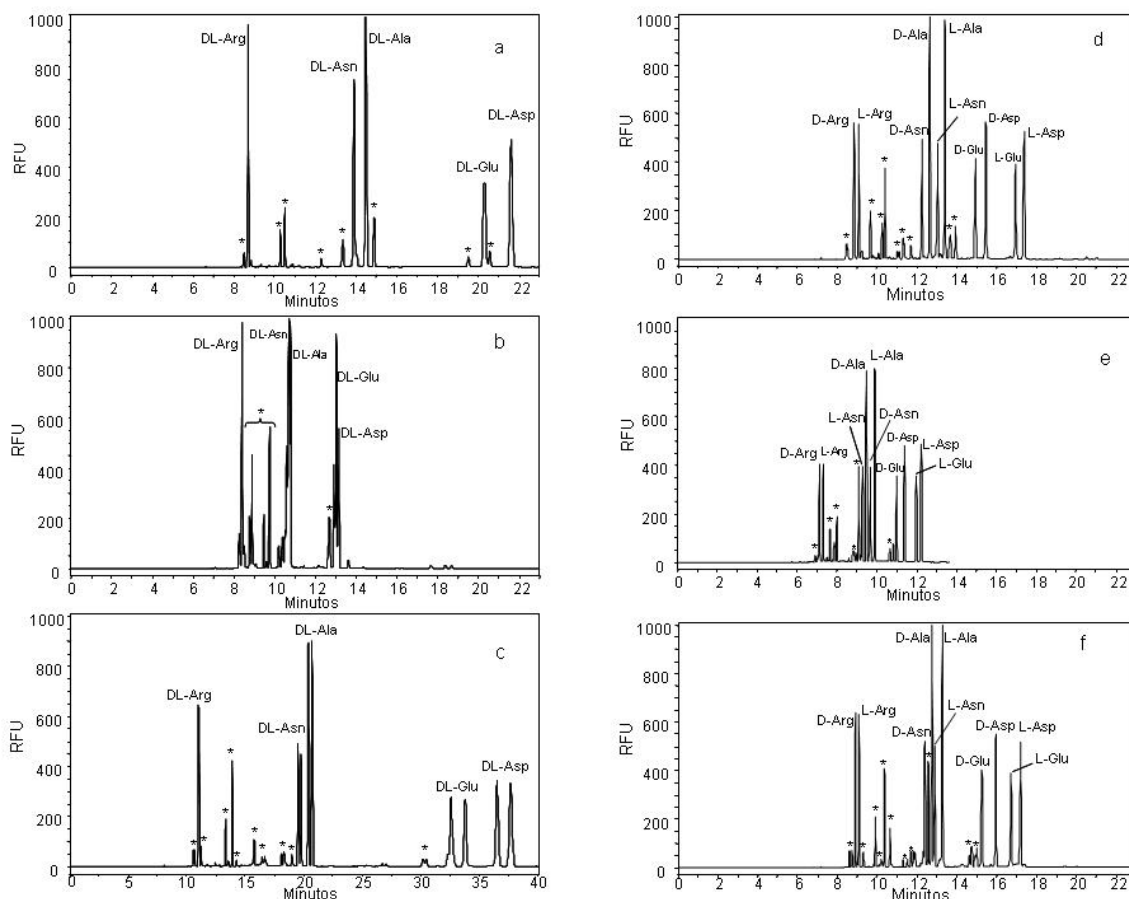
En la etapa inicial de este trabajo, se llevó a cabo un estudio comparativo de cinco ciclodextrinas con el fin de evaluar sus propiedades como selectores quirales en la separación de aminoácidos por electroforesis capilar. Para ello, se investigaron dos ciclodextrinas comerciales,  $\beta$ -CD y  $\gamma$ -CD; y tres ciclodextrinas modificadas, a las que se han unido distintos grupos amino (ver Figura 4.1). En concreto: CD3NH<sub>2</sub> (3-monodeoxi-3-monoamino- $\beta$ -CD), CDampy (6-deoxi-6-[N-(2-metilamino)-piridina]- $\beta$ -CD) y CDen (6-deoxi-6-[1-(2-amino)-etilamino]- $\beta$ -CD). Estas ciclodextrinas modificadas tienen diferentes propiedades ácido-base. CDen tiene la constante de disociación ácido-base, log K, más alta de las tres (8.92) con lo que presenta un grupo amino primario ionizado a pHs ligeramente básicos. Por otro lado, CD3NH<sub>2</sub> tiene un solo grupo amino con un log K de 7.63, mientras que CDampy necesitará un medio más ácido que las otras mCDs para estar completamente ionizada, ya que tiene valores más bajos de log K (6.86 y 2.05). Por tanto, a priori, el comportamiento de estos selectores quirales dependerá del pH del tampón de separación.

Para facilitar este estudio inicial con las diferentes CDs, se seleccionaron diez D- y L-aminoácidos patrón: cuatro cargados negativamente (D/L-Glu y D/L-Asp), 2 con carga positiva (D/L-Arg) y 4 neutros (D/L-Asn y D/L-Ala). Estos aminoácidos patrón se derivatizaron con el reactivo FITC siguiendo un método previamente optimizado en nuestro laboratorio (Herrero y col., 2007). Aunque la derivatización implica una etapa más en el análisis, es la única forma de hacer compatible el análisis de aminoácidos con

la detección ultrasensible que proporciona el empleo de fluorescencia con un láser de argón ionizado, permitiendo así comparar en igualdad de condiciones los resultados obtenidos mediante CE-LIF con los proporcionados por CE-MS. Además, la derivatización mejora también la sensibilidad en CE-MS debido a que las moléculas más grandes tienen mejores rendimientos en la ionización y a que el ruido es menor a masas más altas (Zollner y col., 2003). También facilita la separación quiral de los aminoácidos en CE ya que en la molécula derivatizada aparecen nuevas interacciones con el selector quiral (Rizzi y col., 1995).

#### **4.4.2. Estudio comparativo de las cinco ciclodextrinas como selectores quirales en el análisis de aminoácidos patrón mediante CE-LIF**

Con el objetivo de seleccionar el selector quiral más adecuado para la separación de aminoácidos, se realizó inicialmente un estudio comparativo mediante CE-LIF de las cinco ciclodextrinas. Para ello, se prepararon distintos tampones de separación con cada una de las ciclodextrinas en estudio (100 mM carbonato amónico a pH 8 y con una concentración 2 mM de CD, salvo la  $\beta$ -CD que se preparó a la concentración típica a la que se suele utilizar: 16 mM), y se inyectó la muestra patrón con los 10 aminoácidos derivatizados. La Figura 4.2 muestra las separaciones de los 10 aminoácidos obtenidas por CE-LIF con cada una de las CDs investigadas, así como el análisis obtenido con el tampón sin selector quiral (Figura 4.2a). Como se puede observar, tanto la resolución como el tiempo de análisis fueron mejores usando las mCDs (Figura 4.2d-f) en comparación con la  $\beta$ -CD (Figura 4.2b) y la  $\gamma$ -CD (Figura 4.2c).



**Figura 4.2.** Separación de la muestra patrón de aminoácidos mediante CE-LIF. Tampón de separación: 100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  a pH 8 conteniendo: a) sin selector quiral, b) 16 mM  $\beta\text{-CD}$ , c) 2 mM  $\gamma\text{-CD}$ , d) 2 mM  $\text{CD3NH}_2$ , e) 2 mM  $\text{CDen}$  y f) 2 mM  $\text{CDampy}$ . Capilar de sílice fundida con un diámetro interno de 50  $\mu\text{m}$ , longitud total de 60 cm, longitud efectiva de 50 cm. Voltaje de separación: 20 kV. Temperatura de separación: 30°C. Picos con \* son impurezas procedentes del derivatizante FITC.

En estas condiciones de separación se efectuó un estudio completo de distintos parámetros característicos de la separación (límite de detección, velocidad del análisis, resolución y eficacia de la separación), obtenidos con las cinco ciclodextrinas (Tabla 4.1). Se observó que  $\text{CDen}$  proporcionó separaciones más rápidas que  $\text{CDampy}$  y  $\text{CD3NH}_2$ . Este resultado puede deberse a la protonación de  $\text{CDen}$  en las condiciones de pH empleadas, lo cual aumentaría la carga positiva del complejo  $\text{CDen}$ -aminoácido, disminuyendo así su tiempo de migración. A pesar del mejor tiempo de análisis obtenido con  $\text{CDen}$ , los límites de detección obtenidos fueron mayores (entre  $1.1 \times 10^{-6}$  M y  $7.3 \times 10^{-7}$  M frente a valores de  $10^{-8}$  M para las otras mCDs) y los valores de eficacia fueron menores, hasta  $5.8 \times 10^5$ , frente a  $7 \times 10^5$  obtenidos con  $\text{CDampy}$  y  $\text{CD3NH}_2$ . Por otro lado,  $\text{CDampy}$  proporcionó los valores de límite de detección más bajos (hasta 7.19 nM para D-Arg), lo que podría explicarse por la presencia de un anillo aromático en la molécula, que confiere mayor rigidez al complejo derivatizado. Los valores de eficacia

y de resolución fueron más favorables empleando CD3NH<sub>2</sub>, y a pesar de los mejores resultados obtenidos con CDampy en cuanto a sensibilidad, el resto de parámetros estudiados indicaban la conveniencia de utilizar CD3NH<sub>2</sub> como selector quiral. En consecuencia, se seleccionó CD3NH<sub>2</sub> para llevar a cabo los siguientes experimentos.

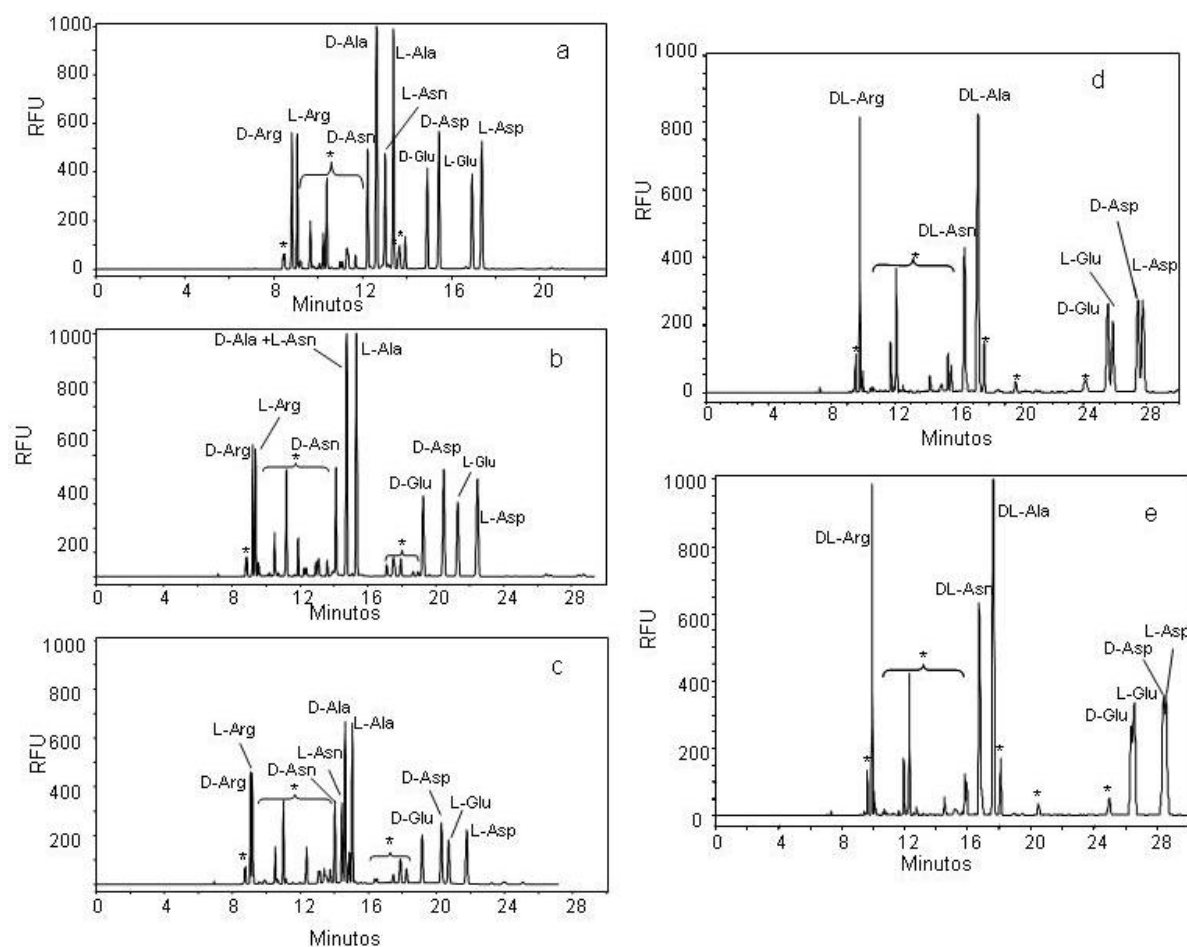
**Tabla 4.1.** Características de las tres ciclodextrinas modificadas empleadas en este trabajo. Las condiciones fueron idénticas a las de la Figura 4.2.

Selector Quiral	aa	t <sub>m</sub> (min) <sup>a</sup>	R <sup>b</sup>	LOD (M) <sup>c</sup>	N (platos/m) <sup>d</sup>
<b>CD3NH<sub>2</sub></b>	D-Arg	8.83	3.23	4.04E-08	4.47E+05
	L-Arg	9.08		4.08E-08	4.14E+05
	D-Asn	12.25	7.30	6.07E-08	4.47E+05
	L-Asn	13.03		6.30E-08	4.45E+05
	D-Ala	12.65	6.97	8.89E-08	3.62E+05
	L-Ala	13.41		9.01E-08	5.92E+05
	D-Glu	14.93	17.91	6.48E-08	7.09E+05
	L-Glu	16.95		6.88E-08	5.81E+05
	D-Asp	15.46	16.59	5.24E-08	6.46E+05
	L-Asp	17.38		5.64E-08	6.28E+05
<b>CDen</b>	D-Arg	7.13	2.56	5.45E-07	2.78E+05
	L-Arg	7.32		5.45E-07	2.93E+05
	D-Asn	9.29	4.37	7.36E-07	3.83E+05
	L-Asn	9.67		7.46E-07	3.69E+05
	D-Ala	9.49	4.92	1.10E-06	3.55E+05
	L-Ala	9.91		1.09E-06	4.72E+05
	D-Glu	11.01	11.38	7.34E-07	5.59E+05
	L-Glu	11.98		7.41E-07	5.88E+05
	D-Asp	11.41	8.82	6.04E-07	5.33E+05
	L-Asp	12.24		5.97E-07	4.61E+05
<b>CDampy</b>	D-Arg	8.91	2.30	7.19E-09	3.89E+05
	L-Arg	9.09		7.29E-09	3.98E+05
	D-Asn	12.41	5.60	1.17E-08	6.82E+05
	L-Asn	12.89		1.22E-08	6.81E+05
	D-Ala	12.75	5.33	1.80E-08	5.35E+05
	L-Ala	13.28		1.80E-08	5.43E+05
	D-Glu	15.26	12.60	1.35E-08	6.50E+05
	L-Glu	16.72		1.41E-08	5.66E+05
	D-Asp	15.96	10.69	1.09E-08	7.01E+05
	L-Asp	17.20		1.16E-08	5.98E+05

a- Tiempo de migración (min)  
b- Resolución  
c- Límite de detección  
d- Eficacia (platos/metro)

Como se ha mencionado anteriormente, uno de los problemas del empleo de las CDs en CE-MS reside en que estas moléculas no son volátiles, lo que incrementa el ruido y reduce la sensibilidad en la detección. Teniendo esto en cuenta, se llevó a cabo el estudio del efecto de la concentración de CD3NH<sub>2</sub> en la resolución de la separación. Para ello, se analizó la misma muestra de aminoácidos patrón utilizando tampones de separación preparados con distintas concentraciones de CD3NH<sub>2</sub> (0.05-2 mM) mediante CE-LIF. En la Figura 4.3 se muestran los electroferogramas que se obtuvieron empleando distintas concentraciones de CD3NH<sub>2</sub>. Como se puede observar, la

resolución de la separación disminuye según disminuye la concentración de CD3NH<sub>2</sub> en el tampón de separación. Observando la Figura 4.3, también se puede deducir que el empleo de concentraciones de CD3NH<sub>2</sub> inferiores a 0.5 mM afectaba negativamente a la separación de los pares de aminoácidos quirales D-Arg/L-Arg, D-Asn/L-Asn y D-Ala/L-Ala. En consecuencia, se seleccionó 0.5 mM CD3NH<sub>2</sub> como la concentración mínima necesaria para obtener una adecuada resolución.



**Figura 4.3.** Análisis quiral por CE-LIF de una mezcla patrón de 10 aminoácidos utilizando CD3NH<sub>2</sub> en el tampón de separación en las siguientes concentraciones: a) 2 mM, b) 1 mM, c) 0.5 mM, d) 0.1 mM y e) 0.05 mM. El resto de condiciones fueron idénticas a las de la Figura 4.2. Picos con \* son impurezas procedentes del derivante FITC.

#### 4.4.3. Empleo de CD3NH<sub>2</sub> como selector quiral en el tampón de separación para el análisis de D/L-aminoácidos mediante CE-ESI-TOF-MS

Para llevar a cabo el desarrollo del método de separación quiral por CE-ESI-TOF-MS, se optimizaron los parámetros del electrospray (flujo y composición del líquido adicional, presión del gas de nebulización, temperatura y flujo del gas de secado) y del

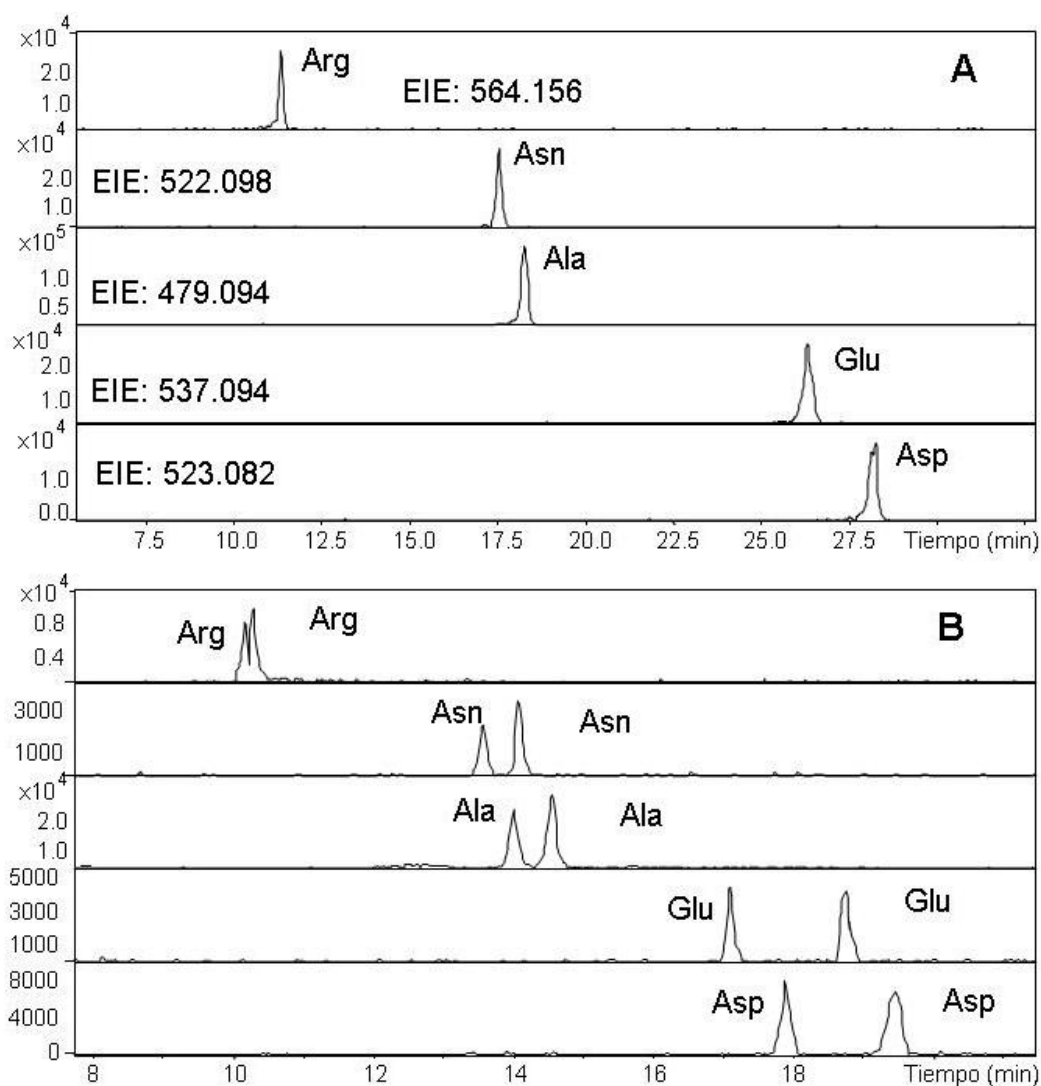
tiempo de vuelo. Las mejores condiciones encontradas fueron 4 L/min de caudal del gas de secado a 180°C, 0.3 bar de presión de nebulización y un líquido adicional compuesto de isopropanol:agua (50:50, v/v) a 0.24 mL/h. En primer lugar se analizó la muestra de aminoácidos patrón por CE-ESI-TOF-MS, en las condiciones de separación seleccionadas mediante CE-LIF, usando primero el tampón sin el selector quiral y posteriormente con una concentración 0.5 mM de CD3NH2. En la Tabla 4.2, se muestran los valores de masa molecular obtenidos en el modo positivo y en modo negativo. Como se puede deducir de los resultados recogidos en la Tabla 4.2, los valores experimentales coincidieron con los esperados teóricamente. Las Figuras 4.4A y 4.4B muestran los EIE obtenidos en el análisis de la muestra patrón por CE-ESI-TOF-MS sin utilizar selector quiral y empleando 0.5 mM de CD3NH2 en el tampón de separación, respectivamente. Al igual que en el análisis por CE-LIF, la presencia de 0.5 mM CD3NH2 en el tampón de separación acortó el tiempo de análisis un 35% (de 28.2 a 19.4 min), Esto se puede explicar por la carga positiva añadida por la mCD en el complejo CD3NH2-aminoácido.

**Tabla 4.2.** Comparación del peso molecular obtenido experimentalmente con el teórico para los aminoácidos patrón estudiados en CE-ESI-TOF-MS en el modo positivo y negativo.

<b>FITC-AA</b>	<b>Mr (Da) teórica</b>	<b>Mr<sub>ESI+</sub> (Da) experimental</b>	<b>Mr<sub>ESI-</sub> (Da) experimental</b>
<b>Arg</b>	563.146	563.149	563.139
<b>Asn</b>	521.088	521.091	521.080
<b>Ala</b>	478.090	478.087	478.076
<b>Glu</b>	536.088	536.087	536.079
<b>Asp</b>	522.072	522.075	522.064

Además, se llevó a cabo la comparación de la sensibilidad (LOD) obtenida en ambos modos de ionización (positivo y negativo). La Tabla 4.3 recoge los resultados obtenidos, en los que se puede observar que el modo positivo (ESI+) proporcionó límites de detección mejores comparados con el modo negativo (ESI-). En estas condiciones de separación, el empleo de 0.5 mM CD3NH2 sólo reduce ligeramente la sensibilidad en la detección mediante espectrometría de masas (Tabla 4.3). En este sentido, se debe considerar la reducción de la sensibilidad motivada por la separación de cada aminoácido en dos picos (conformaciones D- y L-), lo que lógicamente reduce a la mitad la sensibilidad en cualquier separación quiral. Por tanto, la reducción de 3-5 veces observada (con límites de detección de 200-300 nM para cada aminoácido, excepto para

Glu) indicó que el empleo de concentraciones bajas de ciclodextrinas modificadas en CE-MS permite la detección sensible de los aminoácidos quirales con un mínimo efecto de la ciclodextrina sobre la sensibilidad.



**Figura 4.4.** Electroferogramas de iones extraídos de la mezcla patrón de 10 D/L-aminoácidos separados con un tampón de separación (50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  a pH 8.0) sin selector quiral (A) y con 0.5 mM de  $\text{CD3NH}_2$  (B). Capilar de sílice fundida vacío con un diámetro interno de 50  $\mu\text{m}$ , longitud total de 85 cm. Voltaje de separación: 30 kV. Temperatura de separación: 25°C. Inyección durante 25 s por presión de  $\text{N}_2$  (0.5 psi). Líquido adicional: agua:isopropanol (50:50, v/v) a 0.24 mL/h. Polaridad positiva, nebulizador a 0.3 bar, y gas de secado a 4 L/min y 180°C. MS operando entre 200 y 2000  $m/z$  cada 60  $\mu\text{s}$  con un tiempo de almacenamiento de 11.7  $\mu\text{s}$ .



**Tabla 4.3.** Límites de detección en el modo positivo o negativo para los aminoácidos patrón en CE-ESI-TOF-MS sin selector quiral y con 0.5 mM de CD3NH2. El resto de condiciones fueron idénticas a las de la Figura 4.4.

Selector quiral	A.A.	$t_m$ (min) <sup>a</sup>	R <sup>b</sup>	LOD <sub>ESI+</sub> <sup>c</sup> (μM)	LOD <sub>ESI-</sub> <sup>d</sup> (μM)	N° (platos/m)
Ninguno	Arg	11.3	-	0.068	0.144	4.70E+05
	Asn	17.5	-	0.034	0.411	4.99E+05
	Ala	18.2	-	0.079	0.249	3.05E+05
	Glu	26.3	-	0.161	0.351	6.25E+05
	Asp	28.2	-	0.076	0.510	5.16E+05
CD3NH2	D-Arg	10.2	0.93	0.249	-	2.22E+05
	L-Arg	10.3		0.268	-	2.24E+05
	D-Asn	13.6	1.61	0.207	-	6.73E+05
	L-Asn	14.1		0.168	-	7.25E+05
	D-Ala	14.0	1.41	0.369	-	5.67E+05
	L-Ala	14.5		0.376	-	4.95E+05
	D-Glu	17.1	5.15	1.786	-	8.43E+05
	L-Glu	18.7		1.870	-	4.79E+05
	D-Asp	17.9	4.02	0.159	-	5.11E+05
	L-Asp	19.4		0.199	-	2.96E+05

a- Tiempo de migración (min)

b- Resolución

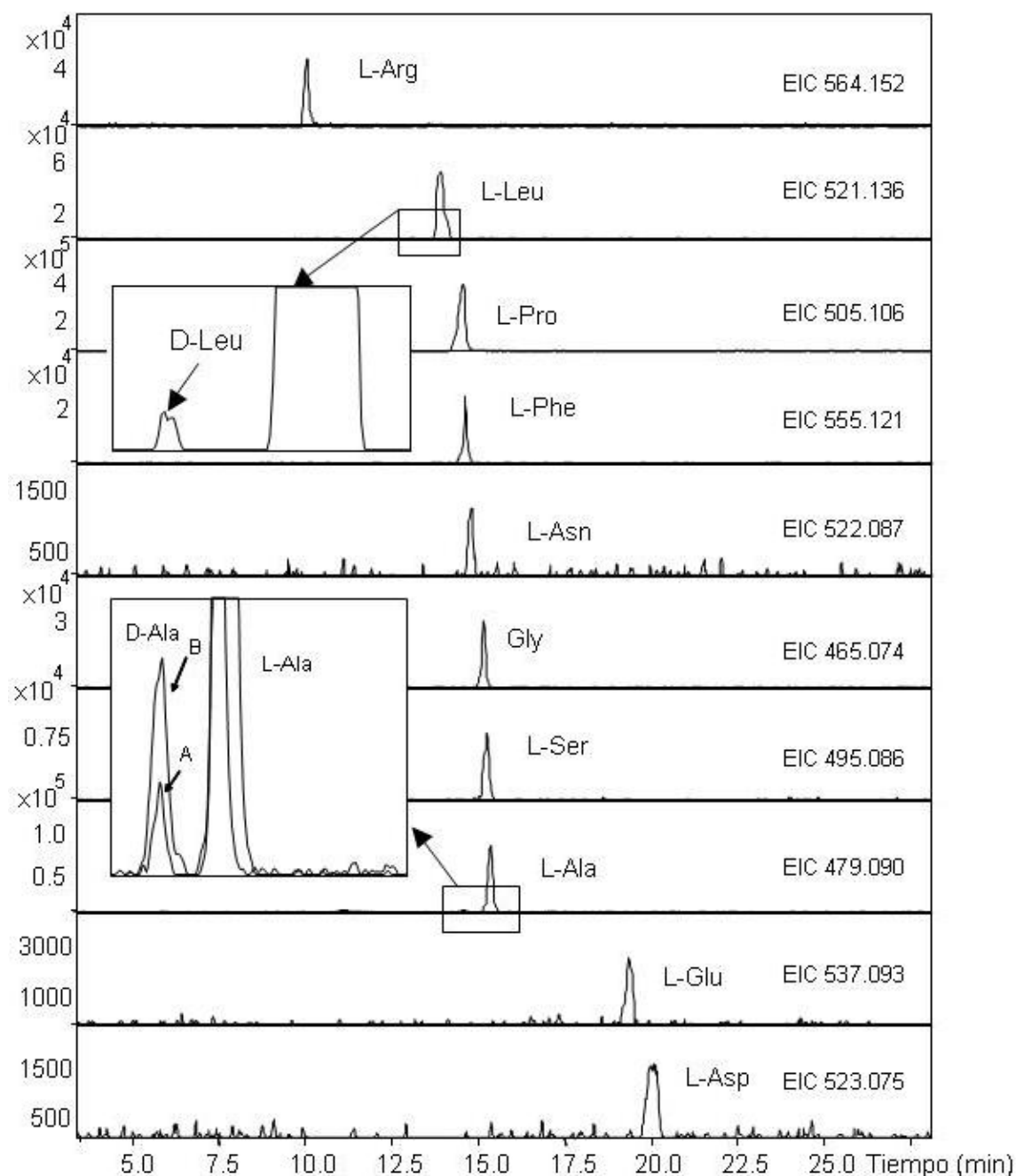
c- Límite de detección en modo positivo

d- Límite de detección en modo negativo

e- Eficacia

#### 4.4.4. Análisis de aminoácidos quirales en muestras reales mediante CE-ESI-TOF-MS

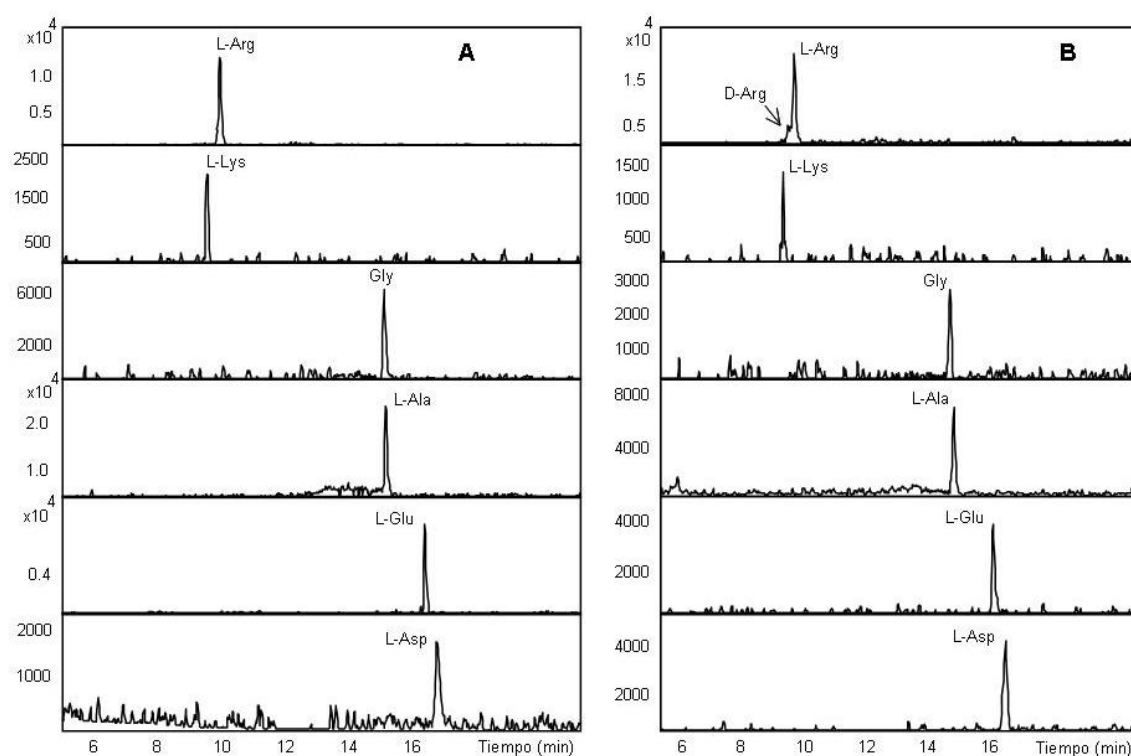
Con el fin de demostrar que el método desarrollado se puede utilizar para la detección de D- y L-aminoácidos en muestras reales, se llevó a cabo su análisis inicialmente en muestras de vinagre (conocidas por contener una elevada cantidad de D- y L-aminoácidos) y a continuación en soja (transgénica y convencional, con el objetivo de poder detectar posibles variaciones en la composición quiral de estos compuestos) mediante el método propuesto de CE-ESI-TOF-MS utilizando 0.5 mM CD3NH2 como selector quiral en el tampón de separación. La Figura 4.5 muestra los electroferogramas de iones extraídos correspondientes a los aminoácidos detectados en una muestra de vinagre. En ellos se puede observar la detección de algunos D-aminoácidos. Estos resultados se confirmaron mediante la co-inyección de un aminoácido patrón (D-Ala) con la muestra (Figura 4.5, trazo B).



**Figura 4.5.** Electroferogramas de iones extraídos de una muestra de vinagre en CE-ESI-TOF-MS. Ampliaciones en D-Ala y D-Leu encontradas naturalmente en vinagre (A) y dopadas con D-Ala y L-Ala (B). Resto de condiciones fueron idénticas a las de la Figura 4.4B.

A continuación se analizaron mediante CE-ESI-TOF-MS los extractos de las dos muestras de soja (variedad transgénica resistente a glifosato y la correspondiente variedad isogénica, cultivadas en las mismas condiciones ambientales). Como se puede observar en la Figura 4.6, se obtuvo un perfil de aminoácidos similar en el análisis de ambas muestras, detectándose Arg, Lys, Gly, Ala, Glu y Asp como aminoácidos mayoritarios. Sin embargo, se observaron algunas diferencias, como por ejemplo, la presencia del aminoácido D-Arg únicamente en el extracto obtenido de la variedad

transgénica de soja. Además, comparando las áreas de los picos (calculadas a partir de los EIE), así como sus intensidades, se observó que los aminoácidos L-Arg y L-Asp aparecen el doble de concentrados en la variedad de soja transgénica que en la variedad de soja convencional, al contrario que los aminoácidos L-Lys, Gly, L-Ala y L-Glu que aparecen más concentrados en ésta última. Recientemente, se ha demostrado que la modificación genética que proporciona la resistencia al glifosato en la soja puede inducir variaciones inesperadas en el perfil y abundancia de algunas proteínas (Yum y col., 2005). En este caso, sin embargo, es necesario efectuar un mayor número de análisis para determinar si estas variaciones inesperadas son debidas a la modificación genética o a otros factores. Este resultado muestra el enorme potencial del análisis quiral mediante CE-MS, incluyendo el estudio de la calidad y seguridad de alimentos transgénicos.



**Figura 4.6.** Electroferogramas de iones extraídos de una muestra de soja convencional (A) y otra transgénica (B) obtenidos mediante el análisis quiral por CE-ESI-TOF-MS. El resto de condiciones fueron idénticas a la Figura 4.4 B.

## 4.5. Conclusiones

El estudio de las ciclodextrinas modificadas realizado en este trabajo muestra que:

- a. Las tres ciclodextrinas modificadas (CDen, CDampy y CD3NH<sub>2</sub>) permiten la separación quiral de mezclas de aminoácidos patrón mediante electroforesis capilar.
- b. La ciclodextrina CD3NH<sub>2</sub> proporciona mejores valores de resolución y eficacia que CDampy y CDen, sin embargo, CDen proporciona menores tiempos de migración y CDampy una mejor sensibilidad.
- c. El método de análisis CE-ESI-TOF-MS desarrollado en este trabajo, empleando 0.5 mM de la ciclodextrina modificada CD3NH<sub>2</sub> en el tampón de separación, permite el análisis directo de aminoácidos quirales en muestras patrón y extractos de vinagre y soja.
- d. Es posible determinar pequeñas variaciones entre las fracciones de aminoácidos quirales procedentes de soja convencional y transgénica empleando la metodología CE-ESI-TOF-MS desarrollada en este trabajo. Estos resultados demuestran el enorme potencial del análisis quiral mediante CE-MS como herramienta avanzada de análisis de alimentos.

**CAPÍTULO V: Estudio de los perfiles  
metabólicos de soja transgénica y soja  
convencional mediante el empleo de CE-  
ESI-TOF-MS**



## 5. Estudio de los perfiles metabólicos de soja transgénica y soja convencional mediante el empleo de CE-ESI-TOF-MS

### 5.1. Introducción

La soja es una planta leguminosa con un elevado porcentaje de proteínas (35%), aminoácidos esenciales, lípidos, fibra dietética, minerales (principalmente potasio y fósforo), vitaminas hidrosolubles e hidratos de carbono (Herrera-Castillón y col., 2006). Esta leguminosa, contiene además, otros metabolitos, como por ejemplo, polifenoles del tipo isoflavonas (genisteína y daidzeína), así como sus precursores glicosilados (genistina y daidzina, respectivamente) (He, 2000).

Como se ha mencionado en el Capítulo I, la variedad de soja RR es el cultivo transgénico que ha alcanzado mayor difusión en el mercado a nivel mundial (James, 2009). El cultivo de soja RR tolera el herbicida glifosato gracias a la inserción del gen EPSPS de la cepa CP4 de la bacteria *A. tumefaciens*, que codifica para una versión del enzima que es resistente a la acción de dicho herbicida (Padgett y col., 1995), permitiendo el crecimiento de la soja RR en un entorno libre de malas hierbas por acción del glifosato.

La soja RR se ha detectado en varias matrices alimentarias (Vaitilingom y col., 1999) empleando PCR convencional, PCR a tiempo real y mediante plataformas de microarrays (van Gotz, 2010). Además, las proteínas y péptidos de la soja RR se han caracterizado empleando técnicas como nano-LC acoplada a espectrometría de masas (Fernández-Ocaña y col., 2007), electroforesis capilar (García-Ruiz y col., 2007) o CE-ESI-TOF-MS (Simó y col., 2010a). En el caso de los estudios metabolómicos en soja RR, se han analizado las diferencias existentes en grupos concretos de metabolitos, como isoflavonas, tocoferoles, esteroides o fosfolípidos. La comparación del perfil de isoflavonas entre soja RR y su respectiva variedad convencional mediante HPLC no reveló diferencias significativas (Wei y col., 2004). Sin embargo, el empleo de HPLC en fase normal y fase reversa permitió detectar diferencias significativas en los perfiles de fosfolípidos entre doce variedades no comerciales de soja transgénica, modificadas para alterar el nivel de ácidos grasos, y una variedad convencional (Mounts y col.,

1996). Por lo tanto, el estudio de los perfiles metabolómicos de OMGs permite investigar los posibles cambios en los niveles de metabolitos como polifenoles, ácidos grasos, vitaminas, aminoácidos, etc., que podrían estar relacionados con la modificación genética *per se* o como resultado de alguna modificación no esperada derivada de la misma (National Research Council of the National Academies, 2004). Estos estudios metabolómicos podrían emplearse para hallar biomarcadores que permitan identificar la presencia de OMGs en alimentos, así como para poder confirmar (o no) la inocuidad y equivalencia sustancial de estos alimentos transgénicos.

## 5.2. Objetivo y plan de trabajo

El objetivo del presente trabajo es desarrollar un procedimiento analítico basado en CE-ESI-TOF-MS para la obtención y comparación de los perfiles metabólicos de muestras de soja transgénica Roundup Ready<sup>TM</sup> y convencional.

Para llevar a cabo este objetivo, se siguió el siguiente plan de trabajo:

- A. Selección de las condiciones de extracción utilizando muestras de soja comercial.
- B. Selección de las condiciones de separación mediante CE-UV y selección de las condiciones de detección mediante CE-ESI-TOF-MS.
- C. Obtención y comparación de los perfiles metabólicos en extractos de soja transgénica RR y su correspondiente variedad convencional empleando CE-ESI-TOF-MS.

## 5.3. Materiales y métodos

### 5.3.1. Reactivos y muestras

Los reactivos empleados en la extracción, separación y análisis de los metabolitos de maíz procedían de distintas casas comerciales. Para la extracción se emplearon: metanol, acetonitrilo, etanol y hexano de Lab-Scan (Dublin, Irlanda) y acetato de etilo de Fluka (Buchs, Suiza). Para los tampones de separación y análisis se emplearon:



bicarbonato amónico de Fluka, acetonitrilo de Lab-Scan, acetato amónico de Panreac Química S.A. (Barcelona, España), hidróxido amónico de Merck (Darmstadt, Alemania), trietilamina (TEA) de Sigma (St Louis, MO, EEUU) e isopropanol de Scharlau (Barcelona, España). El agua empleada se desionizó mediante un sistema Milli-Q de Millipore (Bedford, MA, EEUU).

**Muestras de soja.** Se emplearon las semillas de la variedad transgénica de soja RR y de su correspondiente variedad convencional, donadas por el Dr. G. Dinelli (Universidad de Bolonia, Italia), descritas en el capítulo IV (sección 4.3.1).

**Muestra estándar de soja.** Para la optimización de la extracción de metabolitos, se empleó una muestra de soja comercial, adquirida en una herboristería local (Madrid, España).

### 5.3.2. Extracción de los metabolitos de soja

Las semillas de soja transgénica y convencional se molieron por separado en molinillos distintos a 5°C y la harina se almacenó a 4°C. Se incubó 1 g de la muestra de harina con 15 mL de varias mezclas de disolventes orgánicos en un baño de ultrasonidos durante 30 min. En concreto, se emplearon los siguientes disolventes: metanol, etanol, etil acetato, acetonitrilo y las mezclas metanol:agua (60:40, 80:20, 90:10, v/v), etanol:agua (60:40, 80:20, 90:10, v/v) y acetonitrilo:agua (70:30, v/v). Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 8500 rpm durante 15 min a 5 °C. El sobrenadante se separó en tres alícuotas de 4 mL cada una y se evaporaron empleando un concentrador (Savant SpeedVac SC200 de Thermo, Madrid, España). El residuo seco se resuspendió en 500 µL de cada uno de los disolventes empleados para su posterior análisis. La temperatura a lo largo de todo el proceso de extracción se mantuvo por debajo de 20 °C, para evitar modificaciones en la composición de algunos compuestos de las semillas (Aussenac y col., 1998).

El análisis de los perfiles de los extractos se llevó a cabo inicialmente mediante CE-UV, empleando como tampón de separación una disolución de 100 mM bicarbonato amónico:acetonitrilo (95:5, v/v) a pH 9.

### **5.3.3. Optimización de la separación de los extractos de soja**

Para la optimización de la separación de los extractos de soja se empleó un equipo de electroforesis capilar P/ACE 2100 CE (Beckman Coulter, Fullerton, CA, EEUU) provisto de un detector ultravioleta de filtros. Las longitudes de onda de detección fueron 200 y 280 nm. El instrumento estuvo controlado por un PC y el software System GOLD (Beckman Coulter).

Se emplearon columnas capilares de sílice con un diámetro interno de 50  $\mu\text{m}$  y una longitud total de 90 cm (longitud efectiva de 83 cm) de Composite Metal Services (Worcester, Inglaterra). Los capilares fueron acondicionados previamente a su utilización mediante un lavado durante 30 min con 1 M NaOH, seguido de otro lavado durante 10 min con agua Milli-Q. Entre análisis, se realizó un lavado con una disolución 0.1 M NaOH durante 10 min, seguido de 5 min de agua y tampón de separación durante 10 min. Las muestras se inyectaron a 0.5 psi, en el extremo anódico del capilar, durante 10 segundos (equivalente a un volumen de 7 nL) y la separación se llevó a cabo aplicando un voltaje de 28 kV. Se estudiaron varios tampones de separación a distintos pHs. Finalmente, se seleccionaron tres tampones de separación para su posterior empleo en CE-ESI-TOF-MS: 50 mM bicarbonato amónico a pH 9, 50 mM bicarbonato amónico a pH 9 con un 20% (v/v) de acetonitrilo y 100 mM bicarbonato amónico a pH 9.

### **5.3.4. Análisis de los perfiles metabólicos en extractos de soja mediante CE-ESI-TOF-MS**

El análisis de los perfiles de metabolitos de los extractos de soja se llevó a cabo mediante CE-ESI-TOF-MS empleando la misma instrumentación que la descrita en el apartado 3.3.3 del Capítulo III.

Se empleó un capilar con un diámetro interno de 50  $\mu\text{m}$  y una longitud de 90 cm. Las muestras se inyectaron en el extremo anódico del capilar por presión de  $\text{N}_2$  a 0.5 psi durante 10 segundos. El tampón de separación consistió en una disolución de 50 mM bicarbonato amónico a pH 9. La separación se llevó a cabo aplicando un voltaje de 28

kV. Se fijó una presión de N<sub>2</sub> de nebulización en el electrospray de 0.4 bar y un caudal y temperatura de gas de secado de 4 L/min y 180°C. El líquido adicional estaba constituido por isopropanol: agua (50:50, v/v) con un 0.1% (v/v) de hidróxido amónico, y se impulsó mediante una bomba de jeringa, con un flujo constante de 0.24 mL/h. Los análisis se realizaron en el modo de ionización negativo. Se estableció el análisis en un intervalo de masas de 50 a 1000 m/z. Se realizó un calibrado entre cada análisis empleando una disolución 5 mM de formiato de sodio.

### **5.3.5. Tratamiento de los resultados**

La asignación de fórmulas moleculares a los valores de m/z se realizó mediante la herramienta “Generate Molecular Formula” (GMF) integrada en el programa DataAnalysis (versión 3.3, de Bruker Daltonics). Además, se emplearon las bases de datos ChemSpider, KEGG y PubChem, para la asignación tentativa de compuestos a cada fórmula molecular.

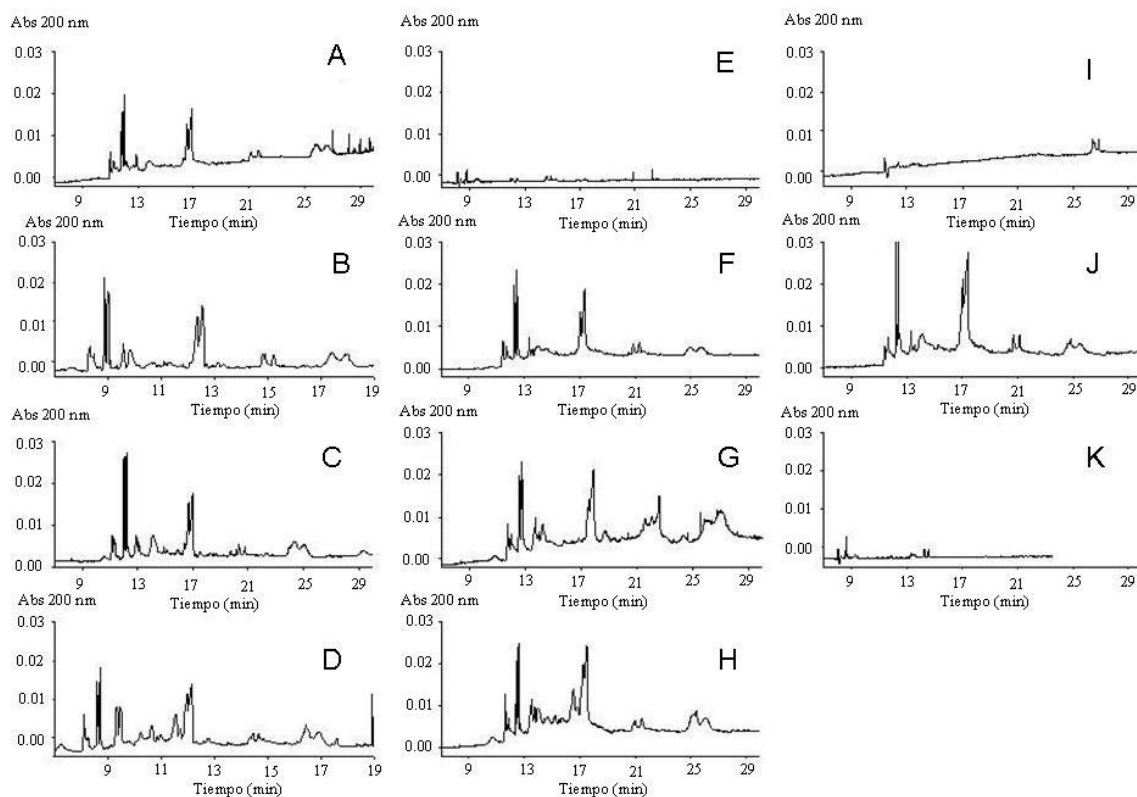
## **5.4. Resultados y discusión**

### **5.4.1. Optimización del método de extracción de metabolitos en muestras de soja**

En primer lugar, se llevó a cabo la optimización del procedimiento de extracción, con el fin de extraer el mayor número de compuestos posible. Para ello, se empleó la muestra de soja comercial obtenida en un herbolario.

Para la extracción, se emplearon varios disolventes orgánicos. En concreto, metanol, etanol, etil acetato, acetonitrilo y las mezclas metanol:agua (60:40, 80:20, 90:10, v/v), etanol:agua (60:40, 80:20, 90:10, v/v) y acetonitrilo:agua (70:30, v/v). Se seleccionaron estos disolventes para la extracción ya que abarcan un amplio intervalo de polaridades. Los extractos obtenidos se analizaron mediante CE-UV, empleando una longitud de onda de 200 nm. Se seleccionaron como condiciones óptimas de extracción aquellas en las que se observaba un mayor número de picos de manera reproducible, ya que se asumió que un mayor número de picos indicaba un mayor número de compuestos

extraídos. En la Figura 5.1, se muestran los electroferogramas de los extractos obtenidos con cada una de estas disoluciones.



**Figura 5.1.** Electroferogramas de los extractos de soja, obtenidos con: A) metanol, B) metanol:agua (90:10, v/v), C) metanol:agua (80:20, v/v), D) metanol:agua (60:40, v/v), E) etanol, F) etanol:agua (90:10, v/v), G) etanol:agua (80:20, v/v), H) etanol:agua (60:40, v/v), I) acetonitrilo, J) acetonitrilo:agua (70:30, v/v), K) acetato de etilo. Condiciones de separación: capilar de sílice fundida, d.i. 50  $\mu\text{m}$ , longitud total 90 cm, longitud efectiva 83 cm, tampón de separación: 100 mM bicarbonato amónico:acetonitrilo (95:5, v/v) a pH 9, voltaje 28 kV, tiempo de inyección 5s a 0.5 psi.

Como se puede observar, en base a la intensidad y al número de picos detectados, las mejores condiciones de extracción se obtuvieron empleando como disolventes las disoluciones de etanol y metanol en agua. En la Figura 5.1, se puede observar que la intensidad de los picos es menor en las muestras extraídas con concentraciones altas (100 y 90:10, v/v) o bajas (60:40, v/v) de disolvente orgánico, que en las muestras extraídas con la mezcla 80:20 (v/v) de disolvente orgánico:agua. Finalmente, se seleccionó la extracción con metanol:agua (80:20, v/v), ya que proporcionaba un mayor número de picos y mejor resueltos (Figura 5.1C) que la extracción con etanol:agua (80:20, v/v) (Figura 5.1G).

#### **5.4.2. Optimización de las condiciones de la separación de los metabolitos de soja mediante CE-UV**

Con el fin de obtener un perfil de metabolitos con alta resolución y sensibilidad se realizó la optimización de las condiciones de separación mediante CE-UV. Para ello, se analizó el efecto de tres parámetros de la separación (tampón de separación, voltaje y tiempo de inyección) sobre el tiempo de migración, la resolución y la sensibilidad.

En primer lugar, se estudió el efecto del tampón de separación. Se emplearon únicamente disolventes volátiles, ya que el tampón de separación debía ser compatible con la interfase electrospray que se iba a utilizar para el posterior análisis mediante CE-ESI-TOF-MS. Se estudió el efecto de dos tampones en el tiempo de migración (A: 100 mM de bicarbonato amónico a pH 10, y B: 100 mM de acetato amónico a pH 10). Se observó que el tampón A proporcionó tiempos de migración menores que el tampón B, por lo que se seleccionó el tampón A para llevar a cabo los siguientes experimentos de optimización. Posteriormente, se estudió el efecto del pH sobre la separación. Para ello, el pH del tampón A se ajustó a 8, 9 y 10, mediante la adición de hidróxido amónico. La separación efectuada a pH 9 proporcionó tiempos de migración menores, así como una mejor eficacia y resolución. A continuación, se ensayaron tres concentraciones de bicarbonato amónico (25, 50 y 100 mM) con el fin de encontrar el valor óptimo de fuerza iónica. El tampón de 50 mM bicarbonato amónico a pH 9 proporcionó tiempos de migración menores, mientras que el tampón de 100 mM bicarbonato amónico a pH 9 proporcionó mejor resolución. Con el fin de mejorar la resolución de ambos tampones de separación, se añadieron distintas cantidades de acetonitrilo como disolvente orgánico. Los mejores resultados en cuanto a resolución, tiempo de migración y sensibilidad se obtuvieron con tres tampones: 50 mM bicarbonato amónico a pH 9, 50 mM bicarbonato amónico a pH 9 con un 20% (v/v) de acetonitrilo y 100 mM bicarbonato amónico a pH 9. Se seleccionaron estos tres tampones para el posterior análisis mediante CE-ESI-TOF-MS.

A continuación, se estudió el efecto del voltaje de separación en el tiempo de migración y la resolución. Se efectuaron separaciones de los extractos aplicando distintos voltajes (20, 25, 28 y 30 kV). Los mejores resultados en cuanto a tiempo de migración y

resolución, se obtuvieron aplicando 28 kV (con un valor de corriente eléctrica de 35  $\mu$ A con el tampón de 50 mM bicarbonato amónico, 28  $\mu$ A con el tampón de 50 mM bicarbonato amónico con 20% (v/v) de acetonitrilo y 65  $\mu$ A con 100 mM bicarbonato amónico).

En cuanto al estudio del efecto del tiempo de inyección, se realizaron inyecciones de los extractos empleando presión de N<sub>2</sub> a 0.5 psi durante 3, 5, 10 y 15 segundos (equivalentes a un volumen de inyección de 2, 4, 7 y 11 nL, respectivamente). Los mejores resultados en cuanto a sensibilidad y resolución se obtuvieron con un tiempo de inyección de 10 segundos.

Por último, se realizó un estudio de la reproducibilidad del método, en las condiciones óptimas de separación, con el tampón de 50 mM bicarbonato amónico a pH 9, 28 kV y 10 s de inyección (0.5 psi). Se analizaron tres extractos obtenidos en extracciones independientes. Cada uno se analizó por triplicado. Los resultados de la desviación estándar (SD) y del coeficiente de variación del tiempo de migración y del área de tres picos se recogen en la Tabla 5.1. Como se puede observar en la Tabla 5.1, el método es reproducible, con una desviación estándar máxima de 11.3% (n=3) en cuanto al área de pico y de 0.56 % (n=3) en cuanto al tiempo de migración para las tres inyecciones de la misma muestra y de 16.4% (n=3) y 0.84% (n=3) para los análisis de los 3 extractos.

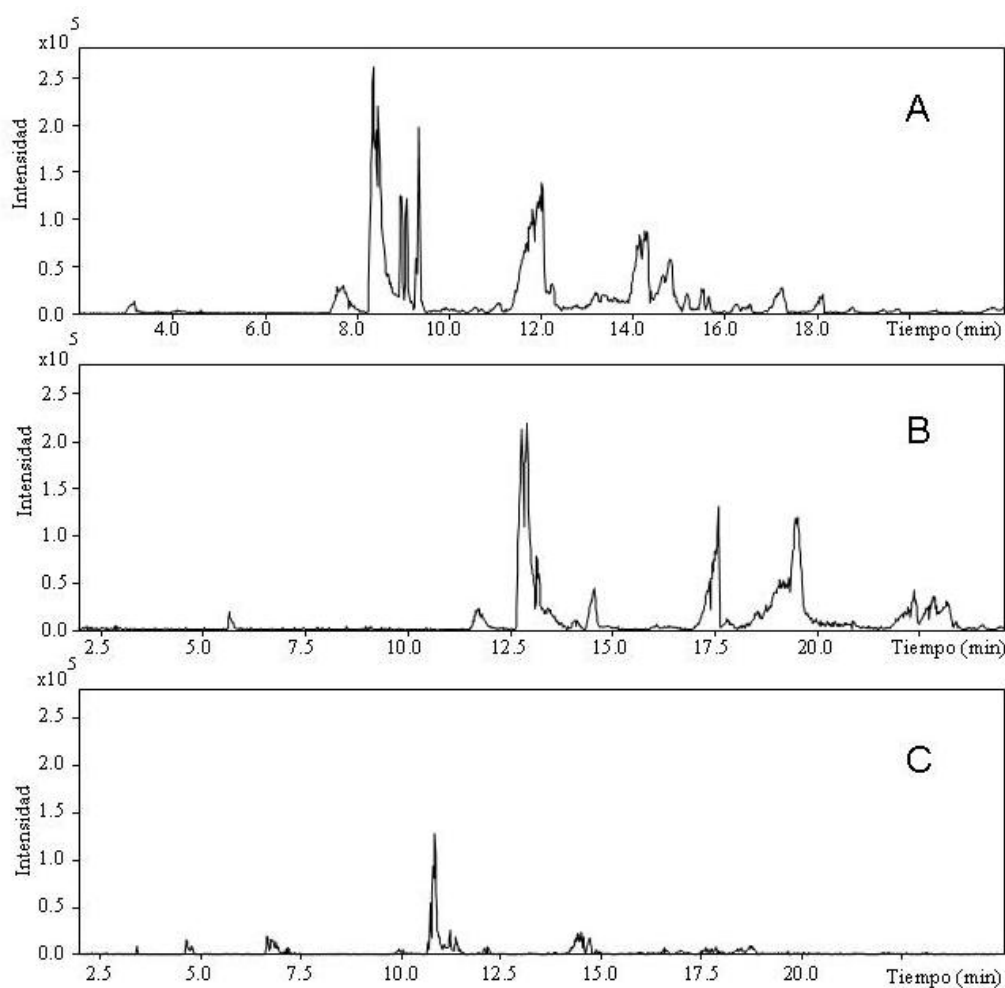
Una vez optimizadas las condiciones de separación, se realizó la optimización de las condiciones de detección mediante CE-ESI-TOF-MS.

**Tabla 5.1.** Media, desviación estándar (SD) y coeficiente de variación (CV%) del área y el tiempo de migración de tres picos, en tres inyecciones consecutivas del mismo extracto, y en tres extractos diferentes.

<b>Inyecciones consecutivas (n=3)</b>			<b>Extractos diferentes (n=3)</b>	
	Área de pico	Tiempo de migración (min)	Área de pico	Tiempo de migración (min)
<b>Media</b>				
Pico 1	0.00151	6.63	0.00130	6.61
Pico 2	0.00130	10.60	0.00111	10.59
Pico 3	0.00560	12.01	0.00490	11.96
<b>SD</b>				
Pico 1	0.000170	0.019	0.000191	0.035
Pico 2	0.000102	0.044	0.000182	0.076
Pico 3	0.000361	0.067	0.000804	0.100
<b>CV%</b>				
Pico 1	11.30	0.29	14.60	0.53
Pico 2	7.88	0.42	16.40	0.72
Pico 3	6.45	0.56	16.40	0.84

#### 5.4.3. Optimización de las condiciones de análisis de los metabolitos de soja mediante CE-ESI-TOF-MS

Con el fin de seleccionar un tampón que proporcionase buenos análisis mediante CE-ESI-TOF-MS, se evaluaron los tres tampones que se habían considerado óptimos mediante CE-UV. En concreto, 50 mM bicarbonato amónico a pH 9, 50 mM bicarbonato amónico a pH 9 con un 20% (v/v) de acetonitrilo y 100 mM bicarbonato amónico a pH 9. Como líquido adicional se empleó una mezcla isopropanol:agua (50:50, v/v) y 0.1% (v/v) de hidróxido amónico. En la Figura 5.2 se muestran los electroferogramas obtenidos utilizando estos tampones de separación. Como se observa en la Figura 5.2, los mejores resultados en cuanto a sensibilidad y resolución se obtuvieron con el tampón de 50 mM bicarbonato amónico (Figura 5.2A).



**Figura 5.2.** Electroferogramas obtenidos mediante CE-ESI-TOF-MS empleando como tampón de separación: A) 50 mM bicarbonato amónico a pH 9, B) 50 mM bicarbonato amónico a pH 9 con 20% (v/v) acetonitrilo y C) 100 mM bicarbonato amónico a pH 9. Resto de condiciones experimentales: voltaje, 28 kV, tiempo de inyección 10 segundos a 0.5 psi (aprox. 7 nL), líquido adicional isopropanol:agua (50:50, v/v) y 0.1% (v/v) hidróxido amónico a 0.24 mL/h, flujo del gas de secado 4 L/min a 180 °C, presión del N<sub>2</sub> de nebulización 4 bar. Ionización en modo negativo. Intervalo de masas 50 a 1000 m/z.

A continuación, se optimizaron los parámetros que afectan a la estabilidad del electrospray, como la composición y el flujo del líquido adicional, la presión del gas de nebulización, el flujo del gas de secado y la temperatura de la cámara de ionización. Estos parámetros se optimizaron en función de la intensidad de la señal de los espectros de masas de los picos del electroferograma.

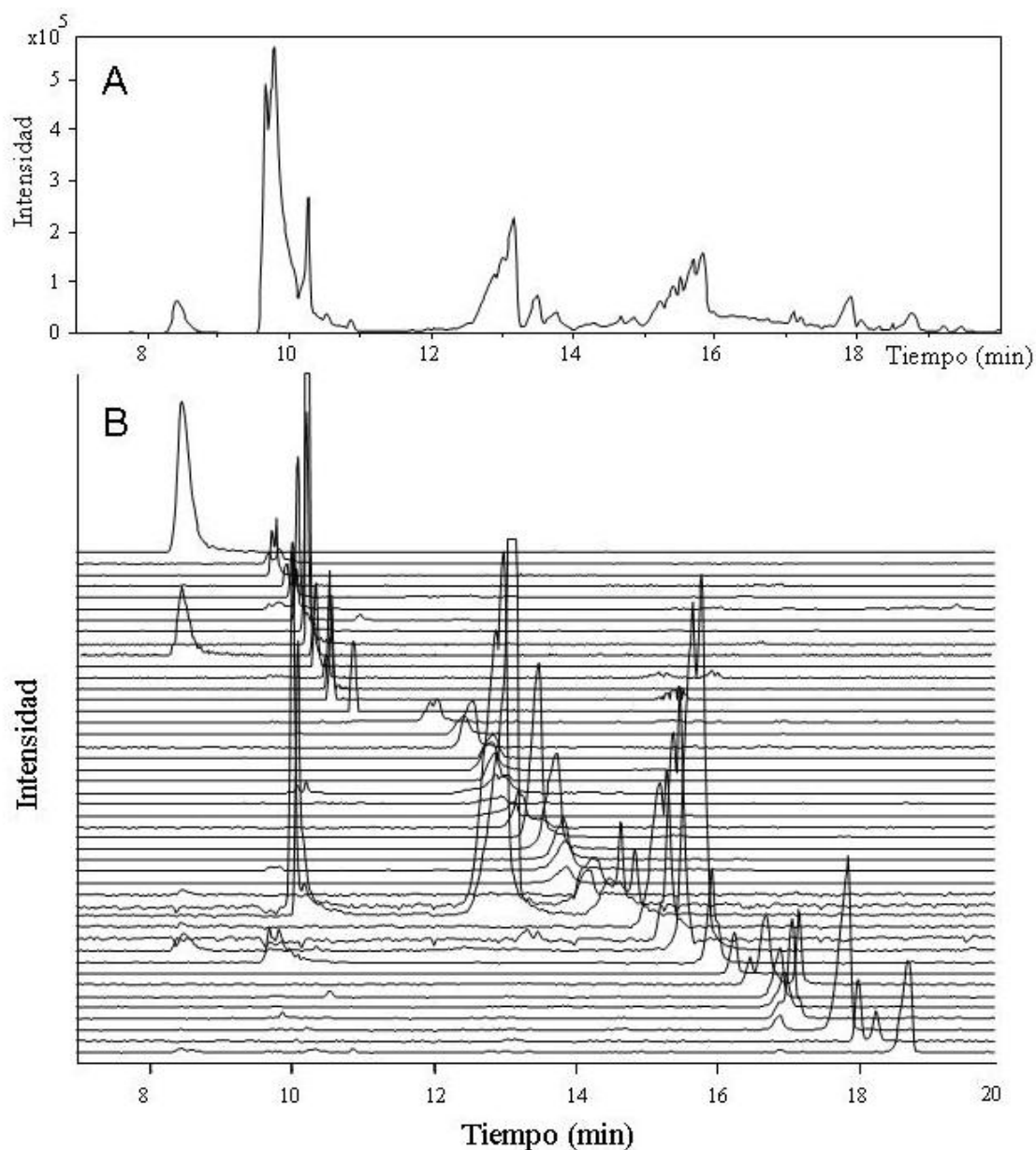
En primer lugar, se evaluó la composición del líquido adicional, con el objetivo de mejorar el rendimiento de la ionización. Se estudiaron cuatro composiciones: A, isopropanol:agua (50:50, v/v) y 0.1% (v/v) TEA; B, isopropanol:agua (50:50, v/v) y 0.5% (v/v) TEA; C, isopropanol:agua (50:50, v/v) y 0.1% (v/v) hidróxido amónico; y D,



isopropanol:agua (50:50, v/v) y 0.5% (v/v) hidróxido amónico. Los mejores resultados en cuanto a intensidad de la señal de los espectros de masas se obtuvieron empleando como líquido adicional isopropanol:agua (50:50, v/v) y 0.1% (v/v) hidróxido amónico. El flujo óptimo de líquido adicional se estableció en 0.24 mL/h, ya que el empleo de flujos más bajos desestabilizaba el electrospray, y el empleo de flujos mayores reducía la intensidad de los espectros de masas debido a un exceso de dilución de los compuestos a la salida del capilar.

El resto de parámetros del electrospray se fijaron en función del flujo de líquido adicional. Los valores óptimos fueron: 0.4 bar de presión del gas de nebulización, 4 L/min de flujo del gas de secado y 180 °C de temperatura del gas de secado.

Por tanto, las condiciones óptimas de separación mediante CE-ESI-TOF-MS fueron: tampón de separación 50 mM bicarbonato amónico a pH 9, 28 kV de voltaje, 10 s de tiempo de inyección (0.5 psi), líquido adicional isopropanol:agua (50:50, v/v) y 0.1% (v/v) hidróxido amónico a 0.24 mL/h, 0.4 bar de presión del gas de nebulización, 4 L/min de flujo del gas de secado y 180 °C de temperatura del gas de secado. Finalmente, se analizaron los extractos de soja comercial, de soja transgénica RR y de su correspondiente variedad isogénica no-transgénica empleando estas condiciones óptimas. En la Figura 5.3, se muestra el electroferograma de pico base (BPE) (Figura 5.3A), así como los EIE de los compuestos detectados en la muestra de soja comercial (Figura 5.3B). La metodología desarrollada en este trabajo permitió la detección de 45 metabolitos en la muestra de soja comercial. A continuación, se procedió a la identificación tentativa de los mismos.



**Figura 5.3.** A) Electroferograma de pico base del extracto de soja comercial mediante CE-ESI-TOF-MS. B) Electroferograma de iones extraídos (EIE) de los compuestos detectados en el extracto de soja comercial mediante CE-ESI-TOF-MS. El resto de condiciones de separación fueron idénticas a las de la Figura 5.2A. Resto de condiciones: ver texto.

#### 5.4.4. Identificación tentativa de compuestos

La identificación tentativa de los compuestos se realizó a partir de los datos de masa exacta y patrón isotópico obtenidos del espectro de masas, junto con la movilidad electroforética de los compuestos en las condiciones de separación empleadas. En primer lugar, la masa exacta y el patrón isotópico, proporcionados por el espectrómetro de masas de tiempo de vuelo, permiten asignar fórmulas moleculares a los valores de

m/z, mediante la aplicación “Generate Molecular Formula” del programa DataAnalysis 3.3. Posteriormente, estas fórmulas moleculares se identificaron tentativamente con compuestos encontrados en las diferentes bases de datos disponibles en internet. La movilidad electroforética de los compuestos tentativos va a depender de la carga de los mismos al pH de la separación. Esta información se emplea como dato adicional para confirmar o descartar las identificaciones realizadas.

En la Tabla 5.2 se recogen los compuestos identificados tentativamente en el extracto de la muestra comercial de soja. En la tabla se muestran, además de los compuestos identificados, los valores experimentales de m/z, el error cometido respecto a la masa teórica, el valor sigma (que representa la diferencia entre el patrón isotópico experimental y el teórico de cada compuesto) y la ruta metabólica en la que se encuentra el compuesto identificado tentativamente.

El primer grupo de compuestos (compuestos 1 al 15 de la Tabla 5.2) migró cerca del flujo electroosmótico. La mayoría de estos compuestos se identificaron como aminoácidos esenciales o derivados de aminoácidos producidos en el metabolismo secundario (Padgett et al., 1996), como por ejemplo prolina, 4-hidroxi-L-treonina, leucina, tirosina o asparagina. Estos aminoácidos tienen un grupo carboxílico que estará completamente ionizado a pH 9, pero también tienen un grupo amino que podría estar protonado a ese pH, dando lugar a una carga neta cercana a cero, lo que explica la migración próxima al flujo electroosmótico. El último grupo en migrar (compuestos del 36 al 45 de la Tabla 5.2), formado entre otros compuestos por el ácido glutámico y el ácido aspártico, corresponde a los compuestos que tienen grupos carboxílicos adicionales que se encuentran totalmente ionizados a pH 9. Por tanto, estos compuestos tendrán mayor carga negativa, la movilidad electroforética aparente más baja y tiempos de migración superiores.

También se detectaron en las muestras de soja algunas isoflavonas descritas previamente en otros estudios (Aussenac et al., 1998; Mellenthin et al., 1999; Cavaliere et al., 2007). En concreto, se detectaron en esta variedad comercial de soja, las isoflavonas daidzeína y genisteína, así como sus derivados malonilglucósidos (daidzeína-7-O-malonilglucósido y genisteína-7-O-malonilglucósido) y los precursores glicosilados (daidzina y genistina).

Tabla 5.2. Metabolitos detectados en los extractos de soja comercial mediante CE-ESI-TOF-MS.

	Masa	t <sub>m</sub> (min)	Fórmula molecular	Error (ppm)	Sigma	Compuesto tentativo	Ruta metabólica	Ref.
1	173.105	8.431	C6H13N4O2	2.4	0.057	Arginina	Metabolismo de arginina y prolina	Padgett y col., 1996
2	845.277	9.686	C37H49O22	-5.9	0.217	Dihidro tetrametoxiflavona triglicósido		
3	431.143	9.787	C22H23O9	-18.9	0.143	Medicarpin 3-O-glucósido	Biosíntesis de isoflavonas	
4	114.056	9.937	C5H8NO2	3.1	0.042	Prolina	Metabolismo de arginina y prolina	Padgett y col., 1996
5	415.106	10.004	C21H19O9	-5.3	0.026	Daidzeina-7-O-glucósido (daidzeina)	Biosíntesis de isoflavonas	Aussenac y col., 1998
6	134.047	10.054	C4H8NO4	-9.4	0.029	4-hidroxi-L-treonina	Metabolismo de vitamina B6	
7	431.098	10.071	C21H19O10	0.1	0.033	Genisteina-7-O-glucósido (genisteina)	Biosíntesis de isoflavonas	Aussenac y col., 1998
8	130.088	10.221	C6H12NO2	-1.8	0.005	Leucina	Degradación de valina, leucina e isoleucina	Padgett y col., 1996
9	203.083	10.272	C11H11N2O2	-2.5	0.006	Triptófano	Metabolismo de triptófano	Padgett y col., 1996
10	131.083	10.339	C5H11N2O2	-0.4	0.044	Ácido 2,5-Diaminopentanoico (ornitina)	Ciclo de la urea y metabolismo de grupos amino	
11	173.094	10.355	C7H13N2O3	-3.5	0.049	N-acetilornitina	Ciclo de la urea y metabolismo de grupos amino	
12	180.067	10.489	C9H10NO3	0.2	0.060	Tirosina	Metabolismo de tirosina	Padgett y col., 1996
13	154.063	10.539	C6H8N3O2	-3.5	0.054	Histidina	Metabolismo de histidina	Padgett y col., 1996
14	164.072	10.573	C9H10NO2	-1.6	0.059	Fenilalanina	Metabolismo de fenilalanina	Padgett y col., 1996
15	131.047	10.890	C4H7N2O3	-4.0	0.037	Asparagina	Metabolismo de alanina y aspartato	Padgett y col., 1996
16	663.267	12.028	C33H43O14	-1.4	0.189			
17	563.162	12.429	C30H27O11	-11.2	0.170	Liquiritigenina-6-cumaril glucósido	Biosíntesis de chalconas (precursor de isoflavona)	
18	443.192	12.596	C21H31O10	0.7	0.138			
19	329.234	12.847	C18H33O5	-2.9	0.116	Ácido Trihidroxioctadeca-11-enoico	Metabolismo de ácido linoleico	
20	449.109	12.864	C21H21O11	-1.6	0.137	Taxifolina 3-ramnósido	Biosíntesis de flavonol	
21	327.216	12.880	C18H31O5	5.3	0.433	2,3-dinor-8-iso prostaglandina F1alfa	Metabolismo de ácido araquidónico	
22	433.113	12.897	C21H21O10	4.2	0.137	Naringenina-7-O-glucósido	Biosíntesis de chalconas (precursor de isoflavona)	
23	501.106	12.998	C24H21O12	2.8	0.279	Daidzeina-7-O-manolilglucósido	Biosíntesis de isoflavonas	Aussenac y col., 1998
24	517.103	13.148	C24H21O13	-0.3	0.137	Genisteina-7-O-manolilglucósido	Biosíntesis de isoflavonas	Aussenac y col., 1998
25	295.228	13.215	C18H31O3	0.2	0.116	Ácido Epoxioctadecenoico	Metabolismo de ácido linoleico	
26	333.060	13.516	C16H13O8	3.1	0.104	6-metoxi-taxifolina	Biosíntesis de flavonol	
27	521.266	13.767	C31H37O7	-22.3	0.174	Kushenol M (dihidro exiguaflavona)	Biosíntesis de flavonona	
28	491.252	13.834	C30H35O6	-17.1	0.168	Sofora-iso- flavanona D	Biosíntesis de flavonona	
29	519.249	13.867	C31H35O7	-19.3	0.174	Exiguaflavanona D	Biosíntesis de flavonona	

Tabla 5.2. (cont). Metabolitos detectados en los extractos de soja comercial mediante CE-ESI-TOF-MS.

	Masa	$t_m$ (min)	Fórmula molecular	Error (ppm)	Sigma	Compuesto tentativo	Ruta metabólica	Ref.
30	505.253	13.901	C <sub>31</sub> H <sub>37</sub> O <sub>6</sub>	13.6	0.174	Kushenol B	Biosíntesis de flavonona	
31	267.068	14.218	C <sub>16</sub> H <sub>11</sub> O <sub>4</sub>	4.4	0.084	Formononetina	Biosíntesis de isoflavonas	
32	253.049	14.671	C <sub>15</sub> H <sub>9</sub> O <sub>4</sub>	4.9	0.095	Daidzeína	Biosíntesis de isoflavonas	Aussenac y col., 1998
33	269.045	14.855	C <sub>15</sub> H <sub>9</sub> O <sub>5</sub>	3.4	0.096	Genisteína	Biosíntesis de isoflavonas	Aussenac y col., 1998
34	309.108	15.290	C <sub>14</sub> H <sub>17</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	4.7	0.014	$\gamma$ - L- Glutamil-L- tirosina	Biosíntesis de dipéptidos (carboxipéptido)	Morris y col., 1962
35	293.114	15.491	C <sub>14</sub> H <sub>17</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	2.5	0.018	$\gamma$ -L-Glutamil-L-fenilalanina	Biosíntesis de dipéptidos (carboxipéptido)	Morris y col., 1962
36	195.051	15.809	C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> O <sub>7</sub>	2.4	0.040	Ácido Glucónico (L-gulonato)	Ruta de las pentosas fosfato	
37	179.056	15.959	C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> O <sub>6</sub>	2.9	0.040	Fuconato	Metabolismo de fructosa y manosa	
38	172.061	16.277	C <sub>7</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	1.1	0.047	Semialdehído N-acetil glutamato	Ciclo de la urea y metabolismo de grupos amino	
39	176.056	16.929	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	5.5	0.042	4-hidroxi-4-metil glutamate	Metabolismo de glutamato	
40	319.082	16.962	C <sub>16</sub> H <sub>15</sub> O <sub>7</sub>	0.3	0.103	4-cumaroilshikimato	Biosíntesis de Fenilpropanoide	
41	149.045	17.079	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> O <sub>5</sub>	4.4	0.033	Ácido Trihidroxipentanoico	Biosíntesis de ácido alquil carboxílico	
42	165.040	17.197	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> O <sub>6</sub>	5.3	0.034	Ácido Tetrahidroxipentanoico (L-xilonato)	Interconversión de pentosas y glucuronato	
43	146.045	17.882	C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	3.6	0.035	Ácido Glutámico	Metabolismo de glutamate	Padgett y col., 1996
44	135.030	18.016	C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> O <sub>5</sub>	2.3	0.027	Trihidroxibutanoato (treonato)	Metabolismo de ascorbato y aldarato	
45	132.030	18.718	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	3.0	0.028	Ácido Aspártico	Metabolismo de alanina y aspartato	Padgett y col., 1996

El orden de migración de las isoflavonas y sus derivados coincide con el esperado en la separación dentro del capilar a pH 9. Los precursores glicosilados (daidzina y genistina) tienen un tiempo de migración inferior al de las isoflavonas (daidzeína y genisteína), debido a su mayor tamaño. Los siguientes en migrar son los derivados malonilglucósidos, ya que a pesar de que tienen una carga negativa adicional (la del grupo malonato), esta carga se compensa con el incremento de tamaño de la molécula. Las isoflavonas (daidzeína y genisteína) migran en último lugar, ya que tienen menor tamaño y mayor densidad de carga negativa. En todos los casos la daidzeína y sus derivados presentan un tiempo de migración menor que la genisteína y sus derivados, debido al grupo hidroxilo presente en la genisteína (McGhie y col., 1994). En los EIE de la Figura 5.3 se puede observar cómo los precursores glicosilados y los derivados malonilglucósidos presentan tres picos. Esto se debe a que estos compuestos contienen los iones correspondientes a sus formas originales, daidzeína (m/z 253.049) y genisteína (m/z 269.045). Los dos primeros picos corresponden a las formas derivadas, mientras que el último corresponde a la isoflavona (genisteína y daidzeína).

Además de las isoflavonas genisteína y daidzeína, se detectaron otros derivados de isoflavonas, como naringenina-7-O-glucósido, medicarpina-3-O-glucósido, taxifolina-3-ramnosido, formononetina o 6-metoxitaxifolina. También es común la presencia de flavonoides glicosilados y acetilados con ácidos como cumárico, malónico y acético, en extractos de plantas (Iwashina, 2000; Cuyckens y col., 2004). En este estudio, se ha detectado el flavonoide liquiritigenina-6-cumarilglucósido en los extractos de soja comercial, así como trazas de otros flavonoides, identificados tentativamente como kushenol M, sofora-iso-flavonona D, exiguaflavonona y kushenol B. Estos flavonoides contienen grupos prenilo, geranilo, lavandulilo y similares, descritos anteriormente en plantas de la familia *Fabacea* (Tahara y col., 1989; Lee y col., 2004). Sin embargo, en este estudio, la identificación de estos compuestos lleva asociado un valor de error y de sigma elevado (Tabla 5.2).

Además de los flavonoides y aminoácidos, se identificaron otros metabolitos en los extractos de soja comercial. En concreto, se detectaron compuestos de la ruta metabólica del ácido linoleico como el ácido trihidroxioctadeca-11-enoico o el ácido epoxioctodecenoico, de la ruta metabólica del ácido araquidónico como el 2,3-dinor-8-iso prostaglandina F1 alfa, o dipéptidos como el  $\gamma$ -L- glutamil-L- tirosina o el  $\gamma$ -L- glutamil-L-fenilalanina.

#### **5.4.5. Comparación entre soja transgénica y convencional**

En la siguiente etapa del trabajo, se llevó a cabo la comparación entre los perfiles metabólicos de los extractos de soja transgénica RR y su correspondiente variedad isogénica no-transgénica. En la Tabla 5.3 se muestran los metabolitos identificados tentativamente en cada una de las muestras. Como se puede observar en la Tabla 5.3, la mayoría de los compuestos se detectaron en ambas variedades de soja.

**Tabla 5.3.** Metabolitos detectados en la variedad de soja transgénica RR y su correspondiente variedad convencional.

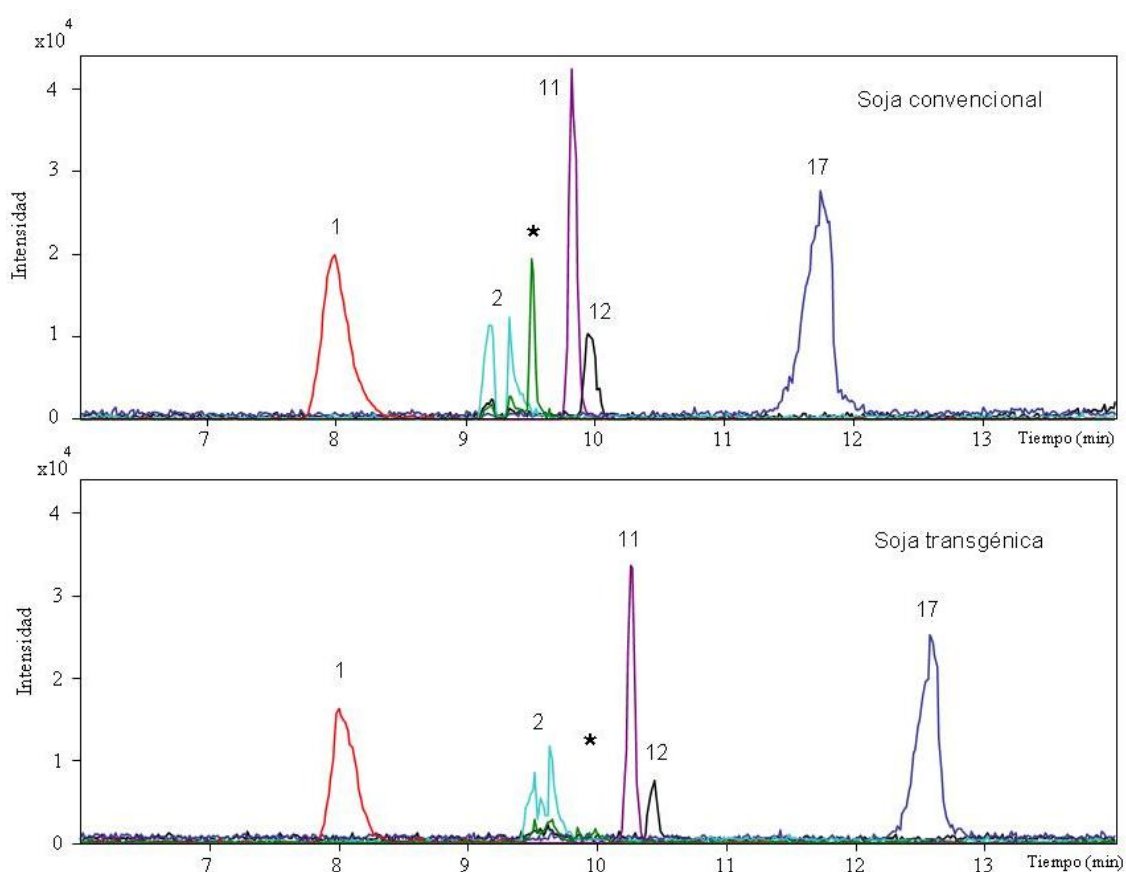
	<b>Masa</b>	<b>Compuesto tentativo</b>	<b>Convencional</b>	<b>Soja RR</b>
1	173.105	Arginina	SI	SI
2	845.277	Dihidro tetrametoxiflavona triglicósido	SI	SI
3	431.143	Medicarpin 3-O-glucósido	SI	SI
4	114.056	Prolina	SI*	SI
5	415.106	Daidzeina-7-O-glucósido (daidzeina)	SI	SI
6	134.047	4-hidroxi-L-treonina	SI	NO
7	431.098	Genisteina-7-O-glucósido (genisteina)	SI	SI
8	130.088	Leucina	SI	SI
9	203.083	Triptófano	SI	SI
10	131.083	Ácido 2.5-Diaminopentanoico (ornitina)	SI	SI
11	173.094	N-acetilornitina	SI	SI
12	180.067	Tirosina	SI	SI
13	154.063	Histidina	SI*	SI
14	164.072	Fenilalanina	SI	SI
15	131.047	Asparagina	SI*	SI
16	663.267	C3343O14	SI	SI
17	563.162	Liquiritigenina-6-cumaril glucósido	SI	SI <sup>&amp;</sup>
18	443.192	C21H31O10	SI	SI
19	329.234	Ácido Trihidroxi octadeca-11-enoico	SI	SI
20	449.109	Taxifolina 3-ramnósido	SI	SI
21	327.216	2.3-dinor-8-iso prostaglandina F1 alfa	SI	SI
22	433.113	Naringenina-7-O-glucósido	SI	SI <sup>&amp;</sup>
23	501.106	Daidzeina-7-O- manolilglucósido	SI	SI
24	517.103	Genisteina-7-O-manolilglucósido	SI	SI
25	295.228	Ácido Epoxioctadecenoico	SI	SI
26	333.060	6-metoxi-taxifolina	SI	SI <sup>&amp;</sup>
27	521.266	Kushenol M (dihidro exiguaflavona)	SI	SI
28	491.252	Sofora-iso- flavanona D	SI	SI
29	519.249	Exiguaflavanona D	SI	SI
30	505.253	Kushenol B	SI	SI
31	267.068	Formononetina	SI	SI
32	253.049	Daidzeina	SI	SI
33	269.045	Genisteina	SI	SI
34	309.108	γ- L- Glutamil-L- tirosina	SI	SI
35	293.114	γ-L-Glutamil-L-fenilalanina	SI	SI
36	195.051	Ácido Glucónico (L-gulonato)	SI*	SI
37	179.056	Fuconato	SI	SI
38	172.061	Semialdehído N-acetil glutamato	SI	SI
39	176.056	4-hidroxi-4-metil glutamate	SI	SI
40	319.082	4-cumaroilshikimato	SI	SI
41	149.045	Ácido Trihidroxipentanoico	SI*	SI
42	165.040	Ácido Tetrahidroxipentanoico (L-xilonato)	SI	SI
43	146.045	Ácido Glutámico	SI	SI
44	135.030	Trihidroxibutanoato (treonato)	SI	SI
45	132.030	Ácido aspártico	SI	SI

\* el área del pico de la variedad convencional es significativamente mayor que el área del pico de la variedad transgénica (p>0.95).

& el área del pico de la variedad transgénica es significativamente mayor que el área del pico de la variedad convencional (p>0.95).

La diferencia más acusada entre la soja RR y su correspondiente variedad convencional, se encontró en el compuesto 6 (Tabla 5.2), identificado tentativamente como 4-hidroxi-L-treonina (m/z 134.047). La Figura 5.4 muestra la comparación entre los EIE de

algunos de los compuestos detectados mediante CE-ESI-TOF-MS en los extractos de la variedad de soja RR y su correspondiente variedad convencional. Como se puede observar en los electroferogramas de la Figura 5.4, no se detectó el pico correspondiente a 4-hidroxi-L-treonina (marcado con \*) en el extracto de la variedad de soja RR. Por tanto, este compuesto podría considerarse como un biomarcador de la soja convencional, frente a la transgénica. Sin embargo, para poder confirmar este punto es necesario disponer y analizar un mayor número de muestras.



**Figura 5.4** Comparación de los electroferogramas de iones extraídos (EIEs) de algunos compuestos de la Tabla 5.2 en la variedad de soja transgénica RR y su correspondiente variedad convencional, mediante CE-ESI-TOF-MS. \* corresponde al compuesto identificado tentativamente como 4-hidroxi-L-treonina. El número de los picos corresponde con el de la Tabla 5.2. El resto de condiciones fueron idénticas a las de la Figura 5.2A.

Además de la 4-hidroxi-L-treonina, se encontraron otras diferencias en las intensidades de las señales de algunos compuestos, entre la variedad transgénica y la convencional. Por ejemplo, el análisis de la variedad transgénica de soja mostró concentraciones más elevadas de liquiritigenina-6-cumarilglucósido, naringenina-7-O-glucósido y 6-metoxitaxifolina. En cambio, el análisis de soja convencional mostró concentraciones más elevadas en otros metabolitos en comparación con la soja RR (como prolina,



histidina, asparagina, ácido glucónico y ácido trihidroxipentanoico). En general, los aminoácidos y sus derivados (4-hidroxi-L-treonina) se encuentran en niveles más altos en la variedad convencional que en la transgénica. Aunque la prolina, asparagina y treonina se sintetizan en rutas metabólicas distintas (ruta de glutamina-prolina, ruta de alanina-asparagina y ruta de metionina-treonina, respectivamente), estas rutas se encuentran interconectadas mediante precursores comunes, como el ácido glutámico y el ácido aspártico (Nelson y col., 2000). La soja resistente al glifosato (RR) produce cantidades elevadas del enzima EPSPS. Este enzima se encuentra en la ruta de los aminoácidos aromáticos (ruta del shikimato) que interviene en la síntesis de aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina y triptófano). Las diferentes propiedades alostéricas de la enzima EPSPS de origen eucariota (presente de forma endógena en la soja convencional) y procariota (enzima procedente de *A. tumefaciens*, presente en la soja transgénica) podrían ser la causa de la alteración de los niveles de estos aminoácidos. La diferente regulación de la ruta metabólica del shikimato en la variedad de soja RR y la convencional también puede explicar los cambios en los niveles de liquiritigenina, naringenina y taxifolina, ya que los aminoácidos aromáticos fenilalanina y tirosina intervienen en la síntesis de estos flavonoides.

## 5.5. Conclusiones

El estudio de los extractos de metabolitos de soja muestra que:

- a. La metodología de extracción y posterior análisis mediante CE-ESI-TOF-MS permite obtener e identificar perfiles metabólicos complejos en soja.
- b. La aplicación de dicha metodología ha permitido detectar e identificar más de 40 metabolitos, como isoflavonas, aminoácidos, ácidos carboxílicos y péptidos en muestras de soja.
- c. La metodología desarrollada en este trabajo ha permitido detectar la existencia de algunas diferencias entre la variedad transgénica de soja RR y su correspondiente variedad convencional.

d. El metabolito 4-hidroxi-L-treonina se detectó en la variedad convencional de soja y no se detectó en la variedad transgénica, lo que es un primer indicio para considerar este compuesto como un potencial biomarcador de esta variedad de soja. Sin embargo, para poder confirmar este punto es necesario disponer y analizar un mayor número de muestras.

**CAPÍTULO VI: Estudio de los perfiles  
metabólicos de maíz transgénico y maíz  
convencional mediante el empleo de CE-  
ESI-TOF-MS y FT-ICR-MS**



## 6. Estudio de los perfiles metabólicos de maíz transgénico y maíz convencional mediante el empleo de CE-ESI-TOF-MS y FT-ICR-MS

### 6.1. Introducción

Como ya se ha comentado en el Capítulo I de esta memoria, en la Metabolómica se emplean diferentes técnicas que permiten evaluar el perfil metabólico de un organismo. De este modo, es posible comparar los perfiles metabólicos de varios organismos (Castro y col., 2007) y analizar las variaciones en los mismos, debidas por ejemplo a la respuesta a fármacos (Nicholson y col., 2002; Clayton y col., 2006), al estrés ambiental (Viant y col., 2003), a cambios en la dieta (Wang y col., 2005), a modificaciones genéticas (Le Gall y col., 2003; Manetti y col., 2004), etc. La Metabolómica es una de las estrategias analíticas recomendadas por la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) para llevar a cabo la evaluación de la equivalencia sustancial de los OMGs (National Research Council of the National Academies, 2004).

Las técnicas de análisis empleadas hasta la fecha con mayor frecuencia en los estudios metabolómicos de OMGs, han sido la resonancia magnética nuclear (RMN) y la espectrometría de masas (MS). A pesar de que la RMN cuenta con gran aceptación para llevar a cabo estos estudios, en ocasiones no proporciona suficiente sensibilidad. Por otro lado, en los últimos años se ha observado un fuerte incremento del empleo de la espectrometría de masas en estudios metabolómicos (Chen y col., 2008). Los espectrómetros de masas de alta resolución, como TOF-MS o FT-ICR-MS, proporcionan gran exactitud en la determinación de la masa molecular ( $<10$  ppm en el caso de un TOF-MS y  $<1$  ppm un FT-ICR-MS) y por tanto, permiten efectuar la asignación de fórmulas moleculares elementales a los iones detectados. Además, el continuo progreso de las bases de datos de metabolitos, así como las nuevas herramientas estadísticas de tratamiento de datos, proporcionan información de gran utilidad para la identificación tentativa de los compuestos de la muestra (Nordstrom y col., 2006). Sin embargo, no es posible obtener la identificación inequívoca de un compuesto basándose únicamente en su masa, ya que pueden existir varios compuestos isómeros que tengan la misma fórmula molecular (Chen y col., 2008). En consecuencia, la integración de la información procedente de varias técnicas analíticas de separación

de alta resolución (cromatográficas y electroforéticas), así como de técnicas de extracción de metabolitos más selectivas, como por ejemplo la extracción con líquidos presurizados (PLE) y con fluidos supercríticos (SFE), puede proporcionar información complementaria de gran utilidad para la identificación de metabolitos en mezclas complejas (Mendiola y col., 2007). En el caso de la técnica PLE, es posible llevar a cabo la extracción de compuestos en función de su polaridad, modulando la presión y temperatura con el fin de modificar las propiedades de los disolventes (punto de ebullición, polaridad, solubilidad, constante dieléctrica, etc.) (Mendiola y col., 2007).

## 6.2. Objetivos y plan de trabajo

Los objetivos de este capítulo son:

1. Desarrollar un procedimiento analítico basado en CE-ESI-TOF-MS para la obtención y comparación de los perfiles metabólicos de muestras de maíz transgénico y convencional.
2. Investigar el potencial analítico de la combinación de técnicas de espectrometría de masas, con técnicas de separación y técnicas de extracción selectivas con el fin de profundizar en el estudio de la composición de muestras complejas de metabolitos de maíz transgénico y convencional.

Para llevar a cabo estos objetivos, el apartado de resultados y discusión de este capítulo se ha dividido en dos secciones.

**Sección I:** Análisis comparativo de los perfiles metabólicos de maíz transgénico y convencional mediante CE-ESI-TOF-MS.

Para llevar a cabo el desarrollo del procedimiento de análisis basado en CE-ESI-TOF-MS, se siguió el siguiente plan de trabajo:

**A.** Selección de un método de extracción de metabolitos a partir de muestras de maíz y optimización de las condiciones de extracción.

**B.** Optimización de las condiciones de separación y detección en CE-ESI-TOF-MS.

**C.** Obtención y comparación de los perfiles metabólicos en extractos de diferentes variedades de maíz transgénico y sus correspondientes variedades convencionales mediante el método optimizado de CE-ESI-TOF-MS.

**Sección II:** Análisis metabolómico de maíz transgénico y convencional mediante la combinación de la información de FT-ICR-MS, CE-ESI-TOF-MS y PLE.

Para llevar a cabo el estudio del uso combinado de técnicas de espectrometría de masas con técnicas de separación y de extracción selectiva, se siguió el siguiente plan de trabajo:

**A.** Análisis de los extractos de metabolitos de maíz mediante FT-ICR-MS.

**B.** Análisis de los perfiles metabólicos de maíz mediante el empleo de FT-ICR-MS y de CE-ESI-TOF-MS como técnica complementaria de análisis.

**C.** Obtención y estudio comparativo de los perfiles metabólicos de variedades transgénicas y convencionales de maíz mediante el empleo de PLE, como técnica de extracción selectiva, y FT-ICR-MS.

## **6.3. Materiales y métodos**

### **6.3.1. Reactivos y muestras**

Los reactivos empleados en la extracción, separación y análisis de los metabolitos de maíz fueron los siguientes: para la extracción de los metabolitos a partir de las muestras de maíz se empleó metanol y acetonitrilo de Scharlau (Barcelona, España) y acetona de Lab-Scan (Dublin, Irlanda) con pureza para HPLC, además de etanol de Prolabo (Fountenay sous Bois, Francia), cloroformo (SDS, Peypin, Francia) y hexano de Panreac Química S.A. (Barcelona, España). Para preparar los tampones de separación y

análisis de metabolitos se emplearon bicarbonato amónico de Fluka (Buchs, Suiza), metanol con pureza para LC-MS y ácido fórmico de Riedel-de Haën (Seelze, Alemania), acetato amónico de Panreac Química S.A., ácido acético de Merck (Darmstadt, Alemania) y metanol e isopropanol de Scharlau. El agua empleada se desionizó mediante un sistema Milli-Q de Millipore (Bedford, MA, EEUU).

**Muestras de maíz.** Se emplearon las semillas de las variedades transgénicas de maíz PR33P67, Tietar Bt y Aristis Bt y de sus correspondientes variedades sin la modificación genética (PR33P66, Tietar y Aristis) descritas en el capítulo III (sección 3.3.1). La preparación de las muestras a partir de las semillas se realizó moliendo por separado las semillas transgénicas y las convencionales en dos molinillos distintos.

### **6.3.2. Procedimientos de extracción de metabolitos de maíz**

#### 6.3.2.1. Extracción mediante ultrasonidos

Se estudiaron varios métodos de extracción de metabolitos con el fin de determinar el método que proporcionase mejor rendimiento y reproducibilidad en cuanto al número de metabolitos extraídos. La mayoría de los procedimientos ensayados se basaron en el método descrito por Hernández-Borges y col. (Hernandez-Borges y col., 2005a), con modificaciones en la composición y volumen del disolvente. En concreto, estos procedimientos consistieron en la extracción de una cantidad de muestra (0.5, 1 ó 2 g) durante 10 min en un baño de ultrasonidos con un volumen de 3 ó 10 mL de los siguientes disolventes: 1, metanol; 2, acetonitrilo; 3, agua; 4, acetona; 5, etanol:agua (50:50, v/v) y 6, metanol:agua (50:50, v/v). A continuación, las muestras se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 min y los sobrenadantes se filtraron. El disolvente de los extractos se eliminó mediante evaporación en un concentrador y, finalmente, se redisolvieron en 0.5 mL de una disolución metanol:agua (50:50, v/v) para su posterior análisis mediante electroforesis capilar.

El resto de procedimientos de extracción ensayados consistió en la extracción de una cantidad de muestra que se indica en cada caso (0.5 ó 2 g) con una disolución metanol:cloroformo (67:33, v/v) durante 10 min, y la posterior adición de 1 mL de cloroformo y de 1.2 mL de agua. La extracción se dejó durante 1 h a 4°C, y a



continuación, se centrifugó a 11200 rpm durante 20 min. Se transfirió la fase hidroalcohólica a otro tubo y el disolvente se evaporó mediante un rotavapor (Manetti y col., 2004). Finalmente, los extractos secos se redisolviéron en 0.5 mL de una disolución metanol:agua (50:50, v/v) para su posterior análisis mediante electroforesis capilar.

#### 6.3.2.2. Extracción con líquidos presurizados

Para la extracción de metabolitos de maíz transgénico y convencional, mediante PLE, se empleó un sistema de extracción acelerada con disolventes ASE 200 (Dionex, Sunnyvale, CA, EEUU). Se llevaron a cabo extracciones a partir de 1 g de muestra de maíz, finamente molida, con tres disolventes distintos (agua, metanol y hexano) y a diferentes temperaturas de extracción (100 y 175°C). A continuación, los extractos obtenidos mediante este procedimiento de extracción se analizaron mediante FT-ICR-MS.

#### **6.3.3. Análisis de los extractos de metabolitos**

**CE-UV:** Para llevar a cabo tanto la optimización de las condiciones de extracción de metabolitos a partir de muestras de maíz como el análisis comparativo de los distintos procedimientos de extracción con ultrasonidos, se empleó el equipo de electroforesis capilar descrito en el apartado 5.3.3 del Capítulo V. Se emplearon columnas capilares de sílice con un diámetro interno de 50  $\mu\text{m}$  y una longitud total de 50 cm (longitud efectiva de 43 cm) de Composite Metal Services (Worcester, Inglaterra). Los capilares fueron acondicionados previamente a su utilización mediante un lavado durante 20 min con 1 M NaOH, seguido de otro lavado durante 10 min con agua Milli-Q. Al comienzo y al final del día los capilares fueron lavados durante 5 min con 1 M NaOH, otros 15 min con tampón de separación y finalmente se efectuó un lavado con agua. Entre análisis, se realizó un lavado con tampón de separación durante 3 min. Para la optimización de la extracción se empleó un tampón 25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  a pH 8.08 y un tiempo de inyección de 5 segundos (equivalente a una inyección de 7 nL). La separación se llevó a cabo aplicando un voltaje de 20 kV. En la optimización de los parámetros de separación, se emplearon diversos tampones, compatibles con CE-ESI-MS, y con valores de pH entre

1.90 y 8.24 (ver Tabla 6.1) con el fin de encontrar el más apropiado para la separación de los metabolitos de los extractos. Los extractos se inyectaron por presión de N<sub>2</sub> a 0.5 psi durante 15 segundos (equivalente a una inyección de 20 nL) en el extremo anódico del capilar y la separación se llevó a cabo aplicando un voltaje de 20 kV.

**Tabla 6.1.** Tampones de separación utilizados en CE-UV y sus correspondientes valores de pH.

<b>Tampón de separación</b>	<b>pH</b>
2.5 % HCOOH	1.90
5 % HCOOH	1.90
100 mM CH <sub>3</sub> COOH en 15 % MeOH/15 % EtOH	2.39
0.01 M CH <sub>3</sub> COOH	2.79
MeOH/agua/CH <sub>3</sub> COOH (20/79/1)	2.83
50 mM CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> en MeOH/ACN (70/30)	5.10
50 mM CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> en MeOH/ACN (70/30)	6.42
50 mM CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> en MeOH/ACN (75/25)	5.67
50 mM CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> en MeOH/ACN (75/25)	7.00
25 mM NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> en 10% MeOH	7.82
30 mM CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> en MeOH/ACN (70/30)	7.83
50 mM CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> en MeOH/ACN (75/25)	7.89
50 mM NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	7.97
100 mM NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	7.97
30 mM NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> en 20 % ACN	8.08
0.83 % HCOONH <sub>4</sub>	8.24

**CE-ESI-TOF-MS:** Con el fin de obtener perfiles de metabolitos de maíz, se llevó a cabo el análisis de los extractos de maíz mediante CE-ESI-TOF-MS. Para ello, se utilizó la misma instrumentación que la descrita en el apartado 3.3.4 del Capítulo III.

Para llevar a cabo los análisis por CE-ESI-TOF-MS, se utilizó un capilar con un diámetro interno de 50 µm y una longitud de 80 cm. Las muestras fueron inyectadas en el extremo anódico del capilar por presión de N<sub>2</sub> a 0.5 psi durante 15 segundos (11 nL aproximadamente). El tampón de separación consistió en una disolución de ácido

fórmico al 5% (v/v) en agua a pH 1.72. La separación se llevó a cabo aplicando un voltaje de 20 kV. En el electrospray, se fijó una presión de N<sub>2</sub> de nebulización de 0.4 bar, un caudal y temperatura de gas de secado de 4 L/min y 180°C, y un caudal del líquido adicional (isopropanol:agua, 50:50, v/v) de 0.24 mL/h. El análisis se estableció en un intervalo de masas de 150 a 450 m/z. Se realizó un calibrado entre cada análisis empleando una mezcla de acetonitrilo, mezcla calibrante G2421 (Agilent Technologies) y agua (85:10:5, v/v/v).

**FT-ICR-MS:** Los análisis de los extractos metabólicos mediante espectrometría de masas de resonancia de ion ciclotrón con transformada de Fourier se llevaron a cabo con un equipo APEX Qe (Bruker Daltonics), equipado con un imán superconductor de 12 Teslas y una interfase electrospray Apollo II. El calibrado del equipo se realizó inyectando una disolución de arginina de 10 mg/L en metanol (calibrado externo). Los extractos de maíz obtenidos mediante PLE se inyectaron directamente en el espectrómetro de masas empleando una jeringa de 250 µL (Hamilton, Bonaduz, Suiza), impulsada con una bomba de jeringa de Cole Parmer, con un caudal de 0.12 mL/h. Para realizar dichos análisis, se emplearon ambos métodos de ionización, positivo y negativo. El equipo realizó 1000 scans (1 MW) en el modo positivo y 500 scans (4 MW) en el modo negativo. Se estableció el análisis en un rango de masas de 150 a 2000 m/z en los dos modos. Se realizó un calibrado entre cada análisis (calibrado interno) empleando las masas de una mezcla de ácidos grasos en el modo negativo y de una mezcla de diésteres en el modo positivo.

#### 6.3.4. Tratamiento estadístico de los resultados

El tratamiento de datos obtenidos en los análisis con CE-ESI-TOF-MS se llevó a cabo mediante varias herramientas informáticas y estadísticas. El programa DataAnalysis (versión 3.4, de Bruker Daltonics) se empleó tanto para la determinación de la masa exacta, como para la asignación de una fórmula molecular a cada masa, mediante la herramienta GMF. Además, se utilizaron las bases de datos públicas ChemSpider (<http://www.chemspider.com/>), KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>) y PubChem (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) para realizar la identificación tentativa de cada fórmula molecular.

El estudio comparativo de los perfiles de metabolitos obtenidos de las distintas variedades de maíz mediante CE-ESI-TOF-MS se realizó mediante el análisis de componentes principales, utilizando para ello la subrutina PCA del programa Matlab (Mathworks Inc., USA, <http://www.mathworks.com>). Los datos correspondientes a las áreas de los picos se normalizaron previamente, mediante su conversión a escala logarítmica para reducir la influencia de los picos más grandes, y posteriormente se centraron en la media. Con el fin de identificar posibles diferencias estadísticamente significativas entre los valores medios de las áreas de los picos obtenidos en los análisis de la variedad convencional y la variedad transgénica, se realizó el test de la t de Student.

El tratamiento de los datos obtenidos en los análisis de los extractos de maíz mediante FT-ICR-MS se realizó empleando dos programas informáticos distintos: SIMCA-P 11.5 (Umetrics, Umea, Suecia) y SAS (version 9.1, SAS Institute, Cary, NC, EEUU). La asignación de fórmulas moleculares a cada pico se realizó mediante un programa escrito en Python y Fortran-95 que fue desarrollado por el grupo del Dr. P. Schmitt-Kopplin (departamento de Química Orgánica del GSF Helmholtz Zentrum, Munich, Alemania). Esta asignación de fórmulas moleculares se realizó empleando varios criterios preestablecidos en el programa: regla del nitrógeno, relación  $O/C < 1$ , número de  $H < (2 + 2 \cdot C)$ , número de  $C \leq 100$ , número de  $O \leq 80$ , número de  $N \leq 5$ , número de  $S \leq 1$ . Finalmente, las fórmulas moleculares obtenidas se representaron en un diagrama de van Krevelen para su estudio (van Krevelen, 1950; Hertkorn y col., 2008). Además, los mismos datos obtenidos a partir de los espectros de masas de los extractos de metabolitos de maíz mediante FT-ICR-MS se evaluaron empleando el programa Masstrix (Suhre y col., 2008) para la asignación directa de compuestos a cada m/z.

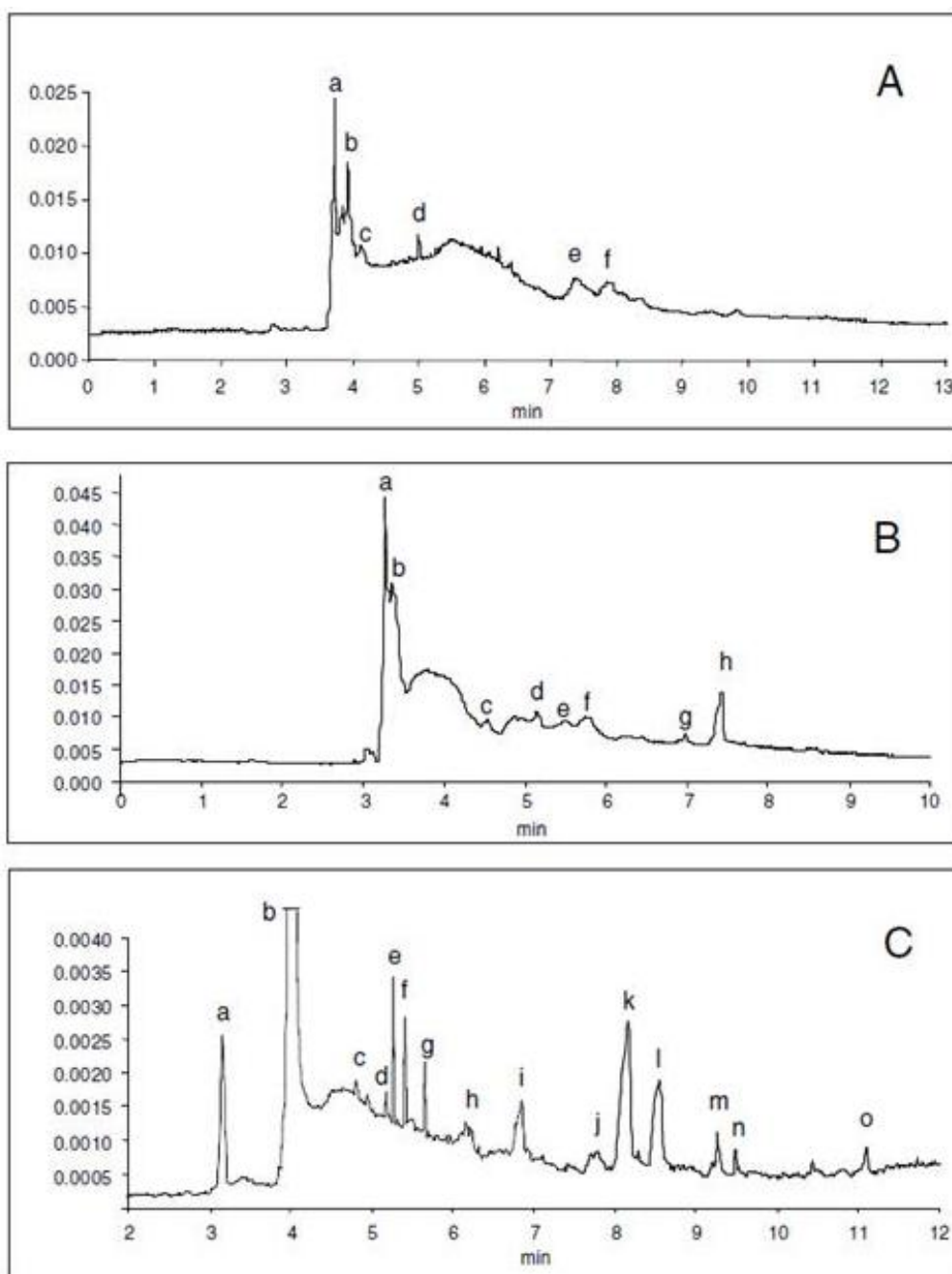
## **6.4. Resultados y discusión**

### **Sección I. Análisis comparativo de los perfiles metabólicos de maíz transgénico y convencional mediante CE-ESI-TOF-MS**

#### **6.4.1. Estudio comparativo de varios métodos de extracción de metabolitos empleando ultrasonidos. Optimización de las condiciones de extracción**

Inicialmente, se realizó un estudio comparativo de varios protocolos de extracción de metabolitos de maíz, con el fin de seleccionar el procedimiento de extracción que proporcionara un mayor número de metabolitos y una buena repetibilidad. En los distintos procedimientos ensayados, se utilizaron varios disolventes (acetona, acetonitrilo, agua, mezclas metanol:agua, etanol:agua, etc), cubriendo así un amplio rango de polaridades, con el fin de extraer el máximo número de metabolitos posible. También se estudió el efecto de otras variables de la extracción, como por ejemplo la cantidad de muestra de partida (0.5, 1 y 2 g) y el volumen de disolvente utilizado (3 y 10 mL), en el rendimiento de la extracción. La muestra empleada para este experimento fue harina de maíz de la variedad Aristis. Los extractos obtenidos a partir de los distintos procedimientos de extracción se analizaron mediante CE-UV. Como se puede observar en los electroferogramas de la Figura 6.1, se obtuvieron distintos perfiles de picos en función del procedimiento de extracción empleado. Los perfiles de los picos obtenidos en las separaciones, permitieron comparar los procedimientos de extracción en cuanto al número de picos obtenidos. En base a esta comparación, y asumiendo que un mayor número de picos está correlacionado con un mayor número de metabolitos extraídos, se seleccionó el procedimiento de extracción que dio lugar a un mayor número de picos en el análisis de los extractos por CE-UV. El proceso de extracción optimizado que se empleó para el resto de los experimentos consistió en extraer 2 gramos de harina de maíz con 10 mL de una mezcla de metanol:agua (50:50, v/v) durante 10 min en baño de ultrasonidos. Seguidamente, la muestra se centrifugó durante 5 min a 3000 rpm y el sobrenadante se filtró. El disolvente de las muestras se eliminó mediante evaporación en un concentrador y, finalmente, el extracto se redisolvió en 0.5

mL de metanol:agua (50:50, v/v) para su posterior análisis mediante electroforesis capilar.



**Figura 6.1.** Electroferogramas obtenidos por CE-UV de los metabolitos extraídos de maíz Aristis usando A) agua, B) etanol:agua (50:50, v/v), y C) metanol:agua (50:50, v/v). Condiciones de separación: Capilar de sílice fundida con un diámetro interno de 50  $\mu$ m, longitud total de 50 cm, longitud efectiva de 43 cm. Tampón de separación: 25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , pH 8.08. Voltaje de separación: 20 kV. Temperatura de separación: 30°C. Inyección durante 5 s por presión de  $\text{N}_2$  (0.5 psi). Detección UV a 200 nm. Las letras corresponden a los distintos picos detectados.

#### **6.4.2. Optimización de las condiciones de separación y detección de los metabolitos de maíz mediante CE-ESI-TOF-MS**

Con el fin de desarrollar un método de separación de los metabolitos de maíz mediante CE, que fuese compatible con ESI-MS y que proporcionase separaciones rápidas y sensibles, se llevó a cabo el estudio del efecto de algunos parámetros en la separación de los metabolitos. La muestra empleada para la optimización fue harina de maíz de la variedad Aristis. En esta etapa inicial del estudio, se estudió el efecto de varios tampones de separación en la separación mediante CE-UV. Los tampones estudiados (Tabla 6.1) se compararon en cuanto a la resolución, la sensibilidad y el tiempo de análisis. Se investigaron 16 tampones con valores de pH entre 1.90 y 8.24. También se optimizaron otras condiciones de la separación, como por ejemplo el voltaje aplicado, la temperatura y el tiempo de inyección, para obtener una mayor sensibilidad y resolución. Finalmente, se seleccionaron las condiciones que proporcionaron los mejores resultados en cuanto a resolución de la separación y velocidad de análisis. El tampón 2.5% (v/v) de ácido fórmico en agua a pH 1.90, proporcionó buenas separaciones de los analitos en menos de 10 min, en las condiciones óptimas de separación (voltaje: 20 kV, temperatura: 30°C, y tiempo de inyección de 15 s).

Una vez optimizadas las condiciones de separación mediante CE, se continuó con el desarrollo del método de análisis mediante CE-ESI-TOF-MS. Para ello, se emplearon las condiciones óptimas de separación obtenidas mediante CE-UV. Durante el desarrollo del método, se modificó ligeramente la composición del tampón de separación. En concreto, se paso de 2.5% (v/v) a 5% (v/v) de ácido fórmico, manteniendo el pH igual a 1.90, con el fin de favorecer la ionización positiva de los metabolitos. Además, se optimizaron los parámetros de la interfase que afectan a la estabilidad del electrospray. Se establecieron las siguientes condiciones óptimas: Temperatura y caudal del gas de secado, 180°C, 4 L/min; caudal del gas de nebulización, 0.3 bar; líquido adicional, constituido por isopropanol:agua (50:50, v/v) a 0.24 mL/h. Los parámetros del analizador de tiempo de vuelo que afectan a la detección de los iones se optimizaron, seleccionando finalmente un tiempo de transferencia de 50  $\mu$ s, y un tiempo de almacenamiento de iones de 5  $\mu$ s.

A continuación, se estudió la repetibilidad de los tiempos de migración y las áreas de tres picos seleccionados en las condiciones óptimas de análisis mediante CE-ESI-TOF-MS. Para ello, se realizaron inyecciones del extracto de maíz de la variedad Aristis por triplicado en las mismas condiciones, obteniéndose valores de RSD inferiores al 1.5 % para los tiempos de migración (n=9) e inferiores al 12% para las áreas de pico (n=9), corroborando la buena repetibilidad del método propuesto.

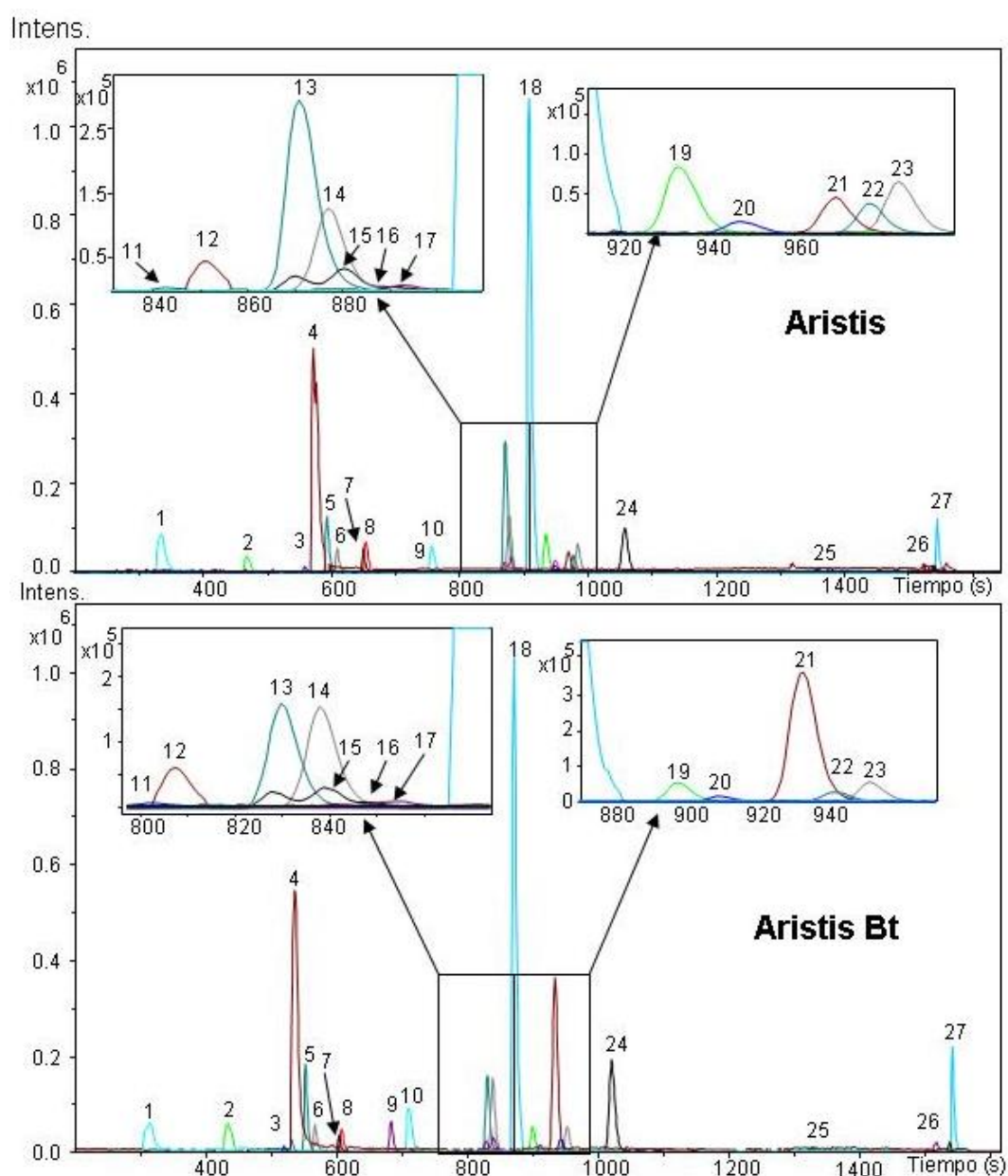
#### **6.4.3. Análisis de los perfiles de metabolitos en extractos de maíz transgénico y convencional mediante CE-ESI-TOF-MS**

Para demostrar la utilidad del método CE-ESI-TOF-MS desarrollado para el análisis de los metabolitos de maíz, se llevaron a cabo las extracciones de los metabolitos a partir de las seis variedades de maíz transgénico y convencional, y se analizaron empleando las condiciones de separación y detección óptimas. En las Figuras 6.2, 6.3 y 6.4, se muestran los electroferogramas de iones extraídos de los compuestos detectados en los extractos de las muestras de maíz transgénico, comparados con los de sus respectivas variedades convencionales: Aristis Bt/Aristis, Tietar Bt/Tietar, y PR33P67/PR33P66, respectivamente.

Con el objetivo de efectuar una identificación tentativa de los analitos detectados, se adoptó una estrategia basada en la combinación de la información de los datos de movilidad electroforética con la obtenida del análisis por CE-ESI-TOF-MS. El acoplamiento CE-ESI-TOF-MS proporciona una elevada exactitud (<10 ppm) en la determinación de la masa de los analitos detectados, lo cual facilita en gran medida la asignación de una fórmula empírica (o fórmula molecular) y una posible estructura molecular a cada analito. La identificación se realizó generando las posibles fórmulas moleculares asociadas a la masa exacta del compuesto mediante la herramienta GMF del programa DataAnalysis 3.3. A partir de la fórmula molecular, se realizaron búsquedas en diversas bases de datos accesibles en internet como KEGG (Kanehisa y col., 2000), Chempidder o PubChem (Bolton y col., 2008) con el fin de identificar tentativamente el metabolito. Posteriormente, se confirmaron los resultados obtenidos de las búsquedas en las bases de datos citadas mediante la comparación de los espectros



de masas con sus patrones isotópicos, así como a través de las movilidades electroforéticas esperadas de los compuestos tentativamente asignados a un valor de pH de 1.90. En base a este procedimiento, se detectaron e identificaron tentativamente 27 metabolitos distintos en el análisis de cada una de las parejas de muestras (variedad transgénica y convencional, Tablas 6.2, 6.3 y 6.4).

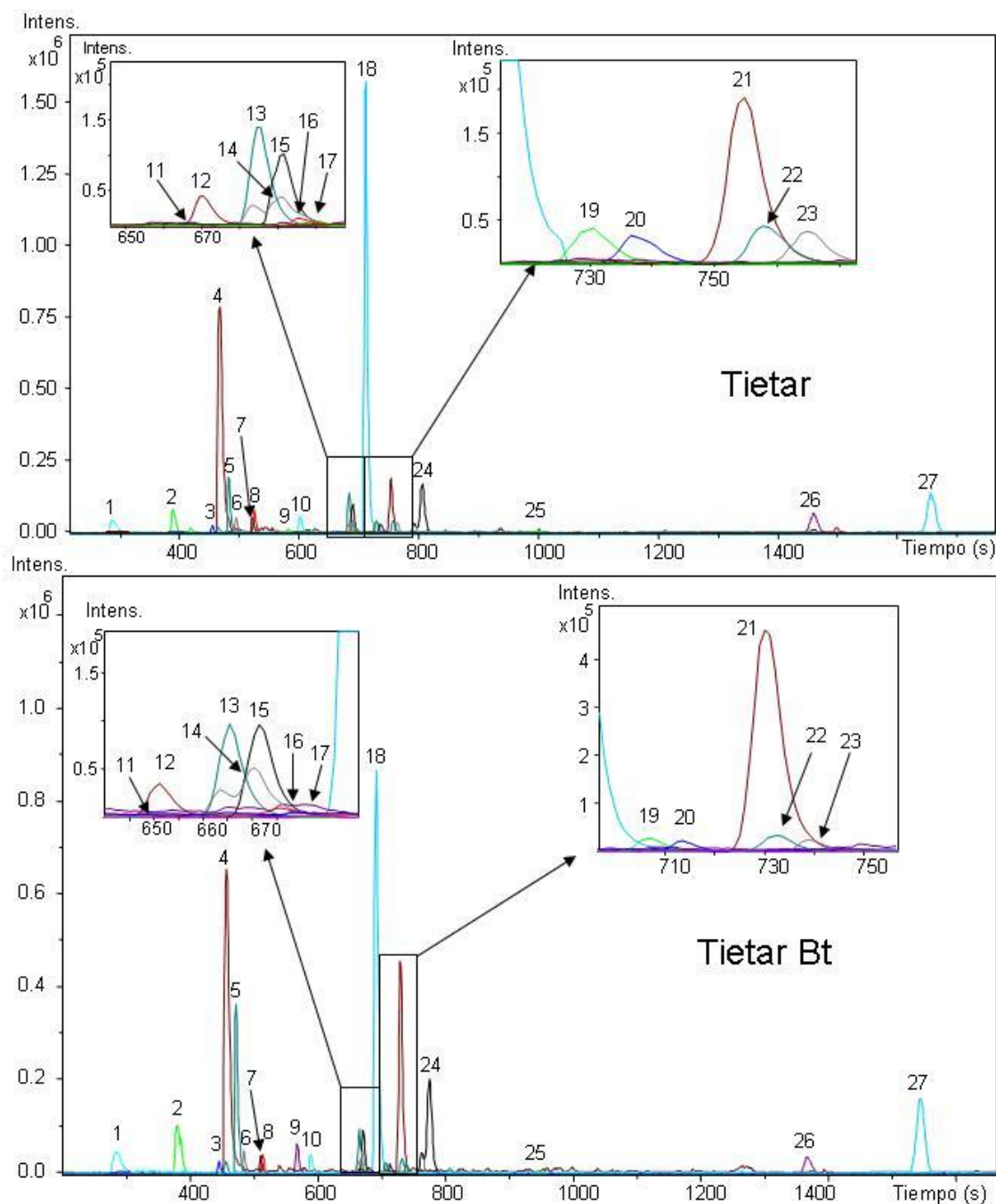


**Figura 6.2.** Electroferograma de iones extraídos de los 27 metabolitos detectados por CE-ESI-TOF-MS en Aristis (convencional) y Aristis Bt (OMG). Condiciones experimentales: tampón de separación, 5% (v/v) ácido fórmico en agua a pH 1.90, longitud del capilar 80 cm, 50  $\mu$ m de i.d., voltaje 20 kV, tiempo inyección 15 seg a 0.5 psi (11 nL), temperatura 30°C, líquido adicional isopropanol:agua (50:50, v/v) a 0.24 mL/h, presión del nebulizador 0.3 bar y gas de secado a 4 L/min y 180 °C. MS operando de 50 a 450 m/z.

En estas condiciones de pH ensayadas (1.90), se deduce que todos los grupos amino estarán cargados positivamente, mientras que los grupos ácidos no estarán cargados o estarán ligeramente ionizados. En consecuencia, los compuestos que presentan un gran número de grupos amino en su estructura, como el 3,5-diaminocaproato, el alcaloide subafilina, o los aminoácidos con dos grupos amino, como arginina fueron los más rápidos en llegar al detector (compuestos 2, 3, 4 y 5 de las Tablas 6.2, 6.3 y 6.4). A continuación, migró un segundo grupo de metabolitos constituido principalmente por los aminoácidos GABA, carnitina, alanina, serina, valina, leucina, treonina y prolina, y por otros compuestos como homoprolina,  $\beta$ -alanil-L-arginina, o trigonelina, un alcaloide presente en muchas variedades vegetales, incluido el maíz (Merck Index, 1989) (compuestos del 8 al 18 en las Tablas 6.2, 6.3 y 6.4).

Tabla 6.2. Metabolitos detectados en maíz Aristis y Aristis Bt mediante CE-ESI-TOF-MS.

Nº comp	Mr <sub>Conv</sub>	Mr <sub>OMG</sub>	Mr teórica	Compuesto tentativo	A <sub>OMG</sub> /A <sub>conv</sub>	Referencia
1	319.217	319.221	319.225	C18H29N3O2	0.790	
2	146.035	146.041	146.105	3.5-Diaminocaproato	2.030	
3	264.091	264.097	264.101	Subafilina	1.019	Harborne y col., 1983
4	103.098	103.104	103.101	Colina	1.010	Shachar-Hill y col., 1996
5	174.104	174.111	174.113	Arginina	0.734	Duke, 1992
6	155.062	155.069	155.071	Histidina	1.013	Duke, 1992
7	135.049	135.057	135.054	Adenina	0.699	
8	103.057	103.064	103.065	GABA	0.653	Shachar-Hill y col., 1996
9	161.100	161.105	161.106	L-Carnitina	10.380	
10	89.042	89.046	89.049	Alanina	1.093	Duke, 1992
11	105.039	105.041	105.042	Serina	1.075	Duke, 1992
12	117.078	117.078	117.080	Valina	1.550	Duke, 1992
13	129.079	129.078	129.080	Homoprolina	0.542	
14	131.095	131.094	131.094	Leucina	1.002	Duke, 1992
15	137.051	137.051	137.049	Trigonelina	1.251	Duke, 1992
16	245.232	245.228	245.148	beta-Alanin-L-arginina	1.259	
17	119.058	119.058	119.059	Treonina	0.724	Duke, 1992
18	115.072	115.071	115.065	Prolina	0.990	Duke, 1992
19	147.054	147.051	147.054	Ácido Glutámico	0.617	Duke, 1992
20	187.061	187.059	187.120	Ácido 7-ceto-8-aminopelargonico	0.932	Eisenber y col., 1968
21	143.096	143.096	143.094	Estaquidrina	8.787	Trinchant y col., 2004
22	181.072	181.070	181.073	Tirosina	0.848	Duke, 1992
23	133.039	133.037	133.039	Ácido Aspártico	0.978	Duke, 1992
24	437.234	437.229	437.231	Lunarina	1.862	Henderson y col., 1950
25	342.105	342.097	342.095	1-Cafeoil-beta-D-glucosa	2.058	
26	279.085	279.080	279.089	Graveolina	0.505	Manetti y col., 2006.
27	214.011	214.010	214.095	Pirimidina nucleósido	1.835	



**Figura 6.3.** Electroferograma de iones extraídos de los 27 metabolitos detectados por CE-ESI-TOF-MS en Tietar (convencional) y Tietar Bt (OMG). Condiciones experimentales: tampón de separación, 5% (v/v) ácido fórmico en agua a pH 1.90, longitud del capilar 80 cm, 50  $\mu\text{m}$  de i.d., voltaje 20 kV, tiempo inyección 15 seg a 0.5 psi (11 nL), temperatura 30°C, líquido adicional isopropanol:agua (50:50, v/v) a 0.24 mL/h, presión del nebulizador 0.3 bar y gas de secado a 4 L/min y 180 °C. MS operando de 50 a 450 m/z.

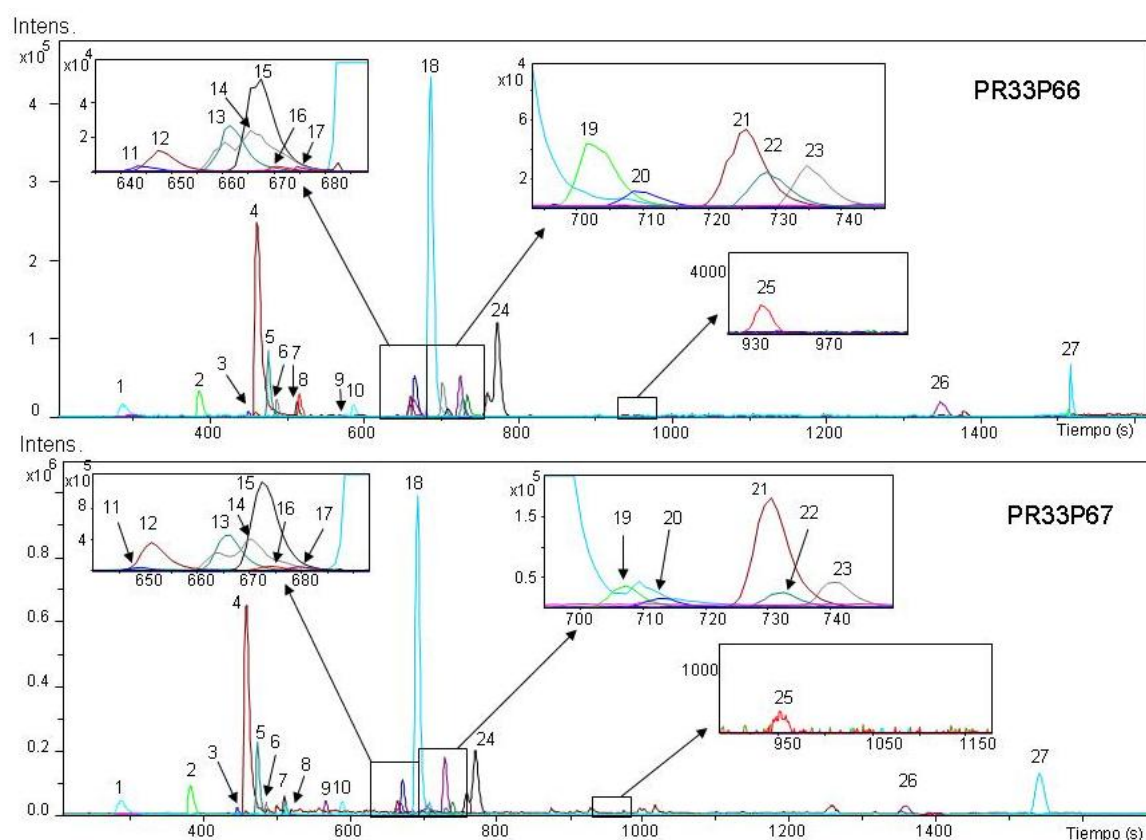
El siguiente grupo en migrar estaba formado también por algunos aminoácidos como tirosina, ácido glutámico o ácido aspártico así como otros metabolitos más ácidos como ácido 7-ceto-8-aminopelargónico o estaquidrina, un alcaloide vegetal (compuestos 19 al 23 en las Tablas 6.2, 6.3 y 6.4). Estos compuestos tienen una compensación de cargas

debida a la presencia de grupos amino y carboxílicos y por tanto, presentan un mayor tiempo de migración. En último lugar, aparecen un grupo de alcaloides como lunarina o graveolina, típicos de algunas plantas, junto con un nucleósido y un polifenol, que debido al alto contenido en oxígeno de la molécula y a la cantidad de grupos ionizables negativamente, tienen una baja densidad de carga positiva (compuestos 24 al 27 en las Tablas 6.2, 6.3 y 6.4).

**Tabla 6.3.** Metabolitos detectados en maíz Tietar y Tietar Bt mediante CE-ESI-TOF-MS.

<b>Nº comp</b>	<b>Mr<sub>Conv</sub></b>	<b>Mr<sub>OMG</sub></b>	<b>Mr teórica</b>	<b>Compuesto tentativo</b>	<b>A<sub>OMG</sub>/A<sub>conv</sub></b>	<b>Referencia</b>
<b>1</b>	319.230	319.219	319.225	C18H29N3O2	1.071	
<b>2</b>	146.043	146.041	146.105	3.5-Diaminocaproato	1.611	
<b>3</b>	264.104	264.095	264.101	Subafilina	1.047	Harborne y col., 1983
<b>4</b>	103.102	103.098	103.101	Colina	0.772	Shachar-Hill y col., 1996
<b>5</b>	174.113	174.107	174.113	Arginina	1.589	Duke, 1992
<b>6</b>	155.071	155.066	155.071	Histidina	0.972	Duke, 1992
<b>7</b>	135.056	135.051	135.054	Adenina	0.786	
<b>8</b>	103.063	103.060	103.065	GABA	0.456	Shachar-Hill y col., 1996
<b>9</b>	161.107	161.100	161.106	L-Carnitina	4.631	
<b>10</b>	89.046	89.043	89.049	Alanina	0.652	Duke, 1992
<b>11</b>	105.040	105.039	105.042	Serina	0.872	Duke, 1992
<b>12</b>	117.081	117.079	117.080	Valina	0.797	Duke, 1992
<b>13</b>	129.081	129.076	129.080	Homoprolina	0.659	
<b>14</b>	131.096	131.090	131.094	Leucina	0.993	Duke, 1992
<b>15</b>	137.083	137.048	137.049	Trigonelina	0.911	Duke, 1992
<b>16</b>	245.237	245.226	245.148	beta-Alanin-L-arginina	0.563	
<b>17</b>	119.060	119.055	119.059	Treonina	0.908	Duke, 1992
<b>18</b>	115.072	115.064	115.065	Prolina	0.683	Duke, 1992
<b>19</b>	147.054	147.050	147.054	Ácido Glutámico	1.116	Duke, 1992
<b>20</b>	187.064	187.057	187.120	Ácido 7-Ceto-8-aminopelargonico	0.569	Eisenber y col., 1968
<b>21</b>	143.097	143.093	143.094	Estaquidrina	2.509	Trinchant y col., 2004
<b>22</b>	181.074	181.065	181.073	Tirosina	0.807	Duke, 1992
<b>23</b>	133.039	133.037	133.039	Ácido Aspártico	1.236	Duke, 1992
<b>24</b>	437.239	437.221	437.231	Lunarina	1.225	Henderson y col., 1950
<b>25</b>	342.105	342.094	342.095	1-Cafeoil-beta-D-glucosa	1.005	
<b>26</b>	279.085	279.076	279.089	Graveolina	0.518	Manetti y col., 2006.
<b>27</b>	214.011	214.000	214.095	Pirimidina nucleósido	1.130	

Las tres Tablas (Tablas 6.2, 6.3 y 6.4), además de mostrar los metabolitos identificados tentativamente en cada una de las parejas, también recogen la comparación de la masa molecular experimental con la esperada teóricamente para cada uno de ellos, así como la relación de las áreas de pico entre la variedad transgénica y la convencional ( $A_{OMG}/A_{conv}$ ). A partir de esta relación se pueden encontrar metabolitos con mayor o menor expresión en las variedades modificadas genéticamente con respecto a las convencionales. Posteriormente, el análisis estadístico de los datos mediante el método de la t de Student indicó la existencia de dos compuestos (9 y 21, Tablas 6.2, 6.3 y 6.4), identificados como L-carnitina y estaquidrina, cuyas áreas de pico mostraron diferencias estadísticamente significativas entre las tres variedades transgénicas y sus respectivas variedades convencionales ( $t_{exp} > 4.6$ ).



**Figura 6.4.** Electroferograma de iones extraídos de los 27 metabolitos detectados por CE-ESI-TOF-MS en maíz PR33P66 (convencional) y PR33P67 (OMG). Condiciones experimentales: tampón de separación, 5% (v/v) ácido fórmico en agua a pH 1.90, longitud del capilar 80 cm, 50  $\mu$ m de i.d., voltaje 20 kV, tiempo inyección 15 seg a 0.5 psi (11 nL), temperatura 30°C, líquido adicional isopropanol:agua (50:50, v/v) a 0.24 mL/h, presión del nebulizador 0.3 bar y gas de secado a 4 L/min y 180 °C. MS operando de 50 a 450 m/z.

Tabla 6.4. Metabolitos detectados en maíz PR33P66 y PR33P67 Bt mediante CE-ESI-TOF-MS.

Nº comp.	Mr <sub>Conv</sub>	Mr <sub>OMG</sub>	Mr teórica	Compuesto tentativo	A <sub>OMG</sub> /A <sub>Conv</sub>	Referencia
1	319.225	319.227	319.225	C18H29N3O2	3.393	
2	146.047	146.046	146.105	3.5-Diaminocaproato	2.937	
3	264.103	264.103	264.101	Subafilina	3.814	Harborne y col., 1983
4	103.106	103.104	103.101	Colina	2.354	Shachar-Hill y col., 1996
5	174.116	174.115	174.113	Arginina	1.273	Duke, 1992
6	155.075	155.072	155.071	Histidina	1.782	Duke, 1992
7	135.060	135.057	135.054	Adenina	3.309	
8	103.068	103.065	103.065	GABA	0.608	Shachar-Hill y col., 1996
9	161.110	161.107	161.106	L-Carnitina	14.427	
10	89.051	89.048	89.049	Alanina	0.724	Duke, 1992
11	105.047	105.044	105.042	Serina	0.726	Duke, 1992
12	117.085	117.083	117.080	Valina	2.692	Duke, 1992
13	129.085	129.081	129.080	Homoprolina	1.702	
14	131.101	131.100	131.094	Leucina	1.488	Duke, 1992
15	137.054	137.055	137.049	Trigonelina	1.964	Duke, 1992
16	245.237	245.237	245.148	beta-Alanin-L-arginina	2.245	
17	119.064	119.059	119.059	Treonina	1.287	Duke, 1992
18	115.073	115.070	115.065	Prolina	2.002	Duke, 1992
19	147.059	147.056	147.054	Ácido Glutámico	0.745	Duke, 1992
20	187.067	187.067	187.120	Ácido 7-ceto-8-aminopelargonico	1.239	Eisenber y col., 1968
21	143.101	143.098	143.094	Estaquidrina	3.259	Trinchant y col., 2004
22	181.077	181.074	181.073	Tirosina	0.966	Duke, 1992
23	133.043	133.041	133.039	Ácido aspártico	1.167	Duke, 1992
24	437.228	437.234	437.231	Lunarina	1.691	Henderson y col., 1950
25	342.100	342.093	342.095	1-Cafeoil-beta-D-glucosa	0.364	
26	279.084	279.085	279.089	Graveolina	1.693	Manetti y col., 2006.
27	214.013	214.010	214.095	Pirimidina nucleósido	6.669	

El metabolito 9 (peso molecular 161.106), identificado como L-carnitina, se encuentra en concentraciones más elevadas en todas las muestras de maíz transgénico. Por tanto, podría ser considerado como un posible biomarcador para el análisis de muestras transgénicas. La L-carnitina es un metabolito implicado en el metabolismo de lípidos, que facilita el transporte de ácidos grasos dentro de la mitocondria para su posterior oxidación. Además, también interviene en el metabolismo de la glucosa favoreciendo el almacenamiento de glucógeno (Stephens y col., 2007). El compuesto 21 (143.094), identificado como estaquidrina (L-prolina betaína), también podría ser utilizado como

biomarcador, ya que se encuentra en mayor concentración en las tres muestras modificadas genéticamente. En algunas variedades hay otros compuestos que se diferencian más de lo estadísticamente esperado. El ácido glutámico (compuesto 19) tiene un área de pico menor en Aristis Bt que en la variedad convencional. La homoprolina (compuesto 13), sin embargo, tiene un área mayor en PR33P67 y Aristis Bt que en sus respectivas variedades convencionales.

#### **6.4.4. Análisis de componentes principales**

Para tener una visión más general de los datos de las 18 muestras (análisis por triplicado de las 6 variedades), se efectuó un análisis de componentes principales a partir de los datos de las áreas correspondientes a siete compuestos distintos (picos 9, 12, 13, 18, 19, 21 y 23 de las Tablas 6.2, 6.3 y 6.4). La matriz inicial de dimensiones 18x7, se redujo a dos componentes principales que explican un 70% de la variabilidad total. En la Figura 6.5 (Bi-plot de las muestras y contribuciones en el plano de coordenadas), se recogen las muestras de maíz en las dos componentes principales obtenidas. Además se recogen los vectores que representan las contribuciones de las variables en el plano de los componentes. Estos datos permiten la adecuada separación de las variedades de maíz transgénicas, alejadas en el plano de las variedades convencionales.

A partir de esta Figura y teniendo en cuenta vectores y muestras se puede concluir que los compuestos 9 y 21 son los principales responsables de las diferencias en todas las variedades transgénicas respecto de las convencionales, teniendo valores mayores en las primeras. A su vez, los compuestos 13, 19 y 23 permiten diferenciar las muestras de Aristis respecto de su variedad transgénica (Aristis Bt), con valores más altos en las variedades convencionales. También se puede pensar que los compuestos 12 y 18 permiten diferenciar las muestras de PR33P66 de su variedad transgénica (PR33P67). De esta forma se confirman los resultados obtenidos con el test de la t de Student que han sido comentados anteriormente.



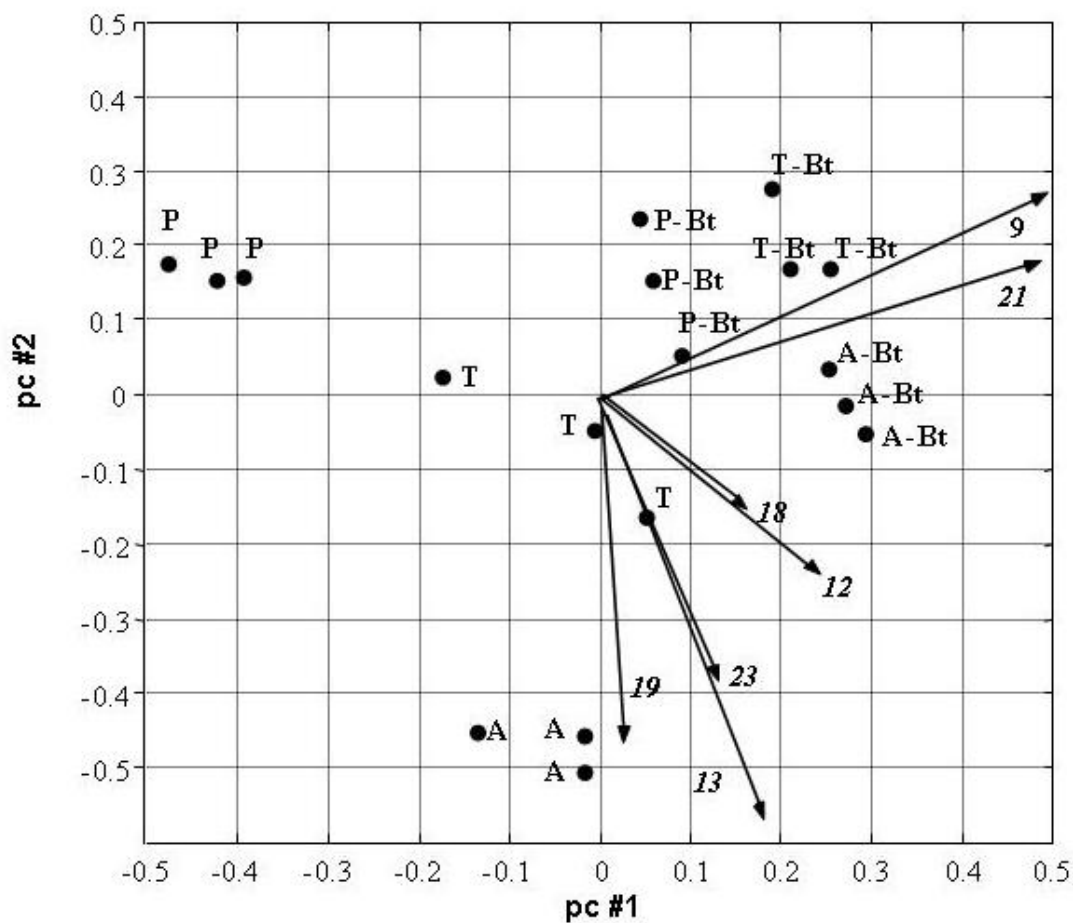


Figura 6.5. Representación de las 18 muestras (6 variedades) de maíz en el plano definido por los dos primeros componentes principales, explicando el 70% de la variabilidad. Los vectores 9, 12, 13, 18, 19, 21 y 23, referidos a los compuestos marcados con esos números en el electroferograma de las Figuras 6.2, 6.3 y 6.4 y las Tablas 6.2, 6.3 y 6.4, representan las contribuciones de las 7 variables en los dos primeros componentes.

## **Sección II. Análisis metabolómico de maíz transgénico y convencional mediante el empleo combinado de FT-ICR-MS, CE-ESI-TOF-MS y PLE**

El objetivo de esta sección fue profundizar en el estudio metabolómico comparativo entre variedades de maíz transgénico y convencional, introduciendo para ello técnicas analíticas avanzadas de extracción (como PLE) y análisis (como FT-ICR-MS).

### **6.4.5. Análisis de los extractos de metabolitos mediante FT-ICR-MS**

El análisis de los extractos obtenidos mediante ultrasonidos a partir de las seis variedades de maíz se llevó a cabo empleando FT-ICR-MS. En primer lugar, se ajustaron los parámetros del instrumento mediante la inyección directa de metanol (a modo de blanco). Posteriormente, se analizó el extracto de la variedad Aristis sin diluir, y diluida 1:20, 1:200 y 1:1000 en metanol. Los mejores resultados en cuanto a intensidad de la señal se obtuvieron con la dilución 1:20. Finalmente, se inyectaron las seis muestras diluidas 1:20, tanto en el modo de ionización positivo (ESI +) como en el negativo (ESI -).

Se obtuvieron alrededor de 5500 señales ( $m/z$ ) con una relación señal/ruido mayor a 2, en el análisis de cada uno de los extractos de maíz. Los valores de  $m/z$  obtenidos en dichos análisis se procesaron empleando la herramienta informática Masstrix (Suhre y col., 2008), un servidor que recoge datos de  $m/z$ , y los asigna a los metabolitos específicos del organismo en estudio (en este caso maíz), empleando la información de la base de datos KEGG (Kanehisa y col., 2000). El servidor Masstrix permite realizar una identificación tentativa de los metabolitos, proporcionando información relativa a las posibles rutas metabólicas en las que pueden estar involucrados. Para llevar a cabo dicha asignación, se establecieron los siguientes criterios: la regla del nitrógeno (los compuestos con un número impar de átomos de nitrógeno tienen un peso molecular impar); la relación  $O/C < 1$ ; y el número máximo de átomos por cada compuesto ( $H < (2+2 \cdot C)$ ,  $C \leq 100$ ,  $O \leq 80$ ,  $N \leq 5$  y  $S \leq 1$ ). En la Tabla 6.5, se recoge el número de metabolitos identificados tentativamente por el servidor Masstrix para cada una de las variedades de maíz estudiadas en este trabajo, empleando ambos modos de ionización.

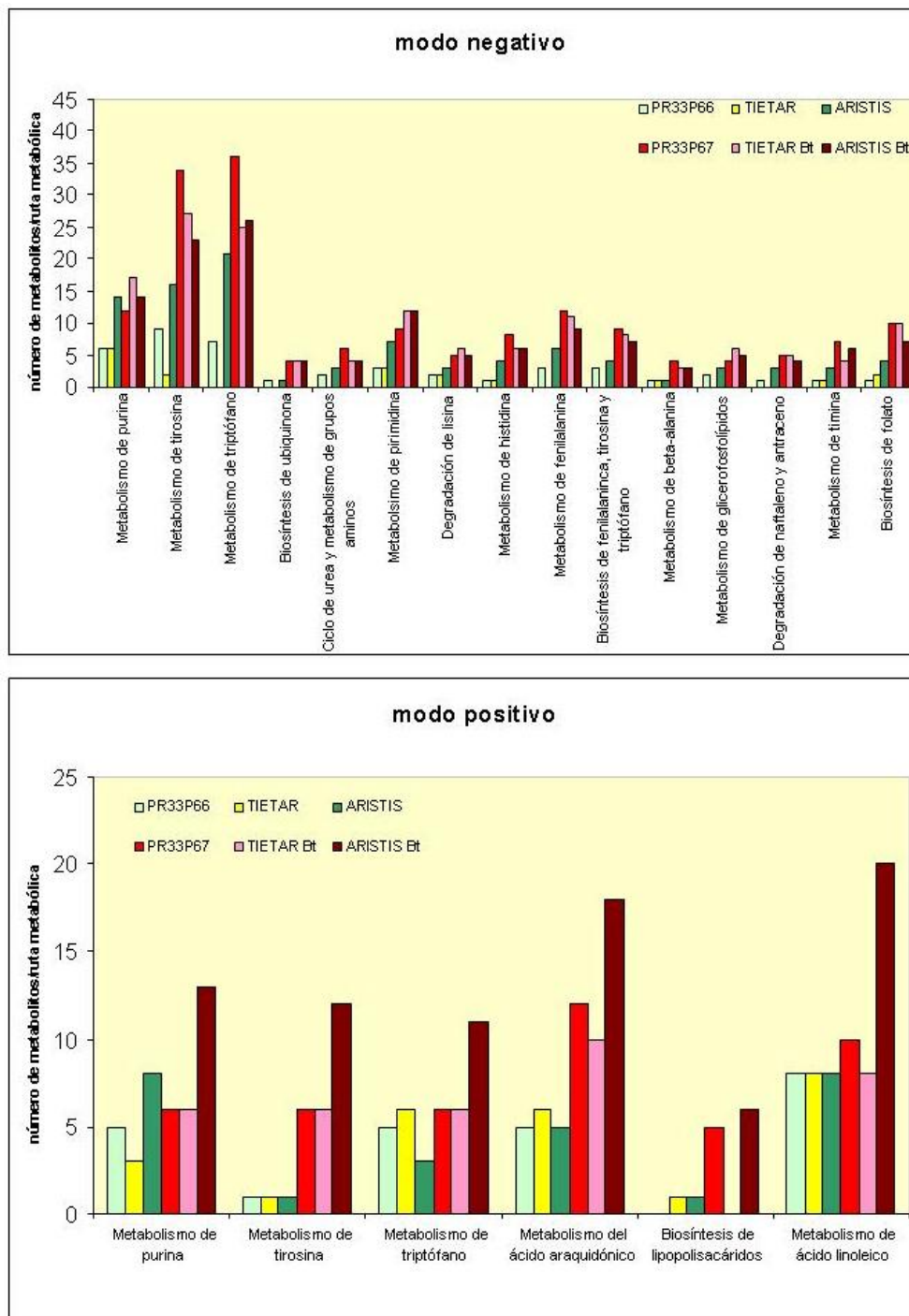
En esta Tabla 6.5, se puede observar que se identificaron un mayor número de metabolitos en las variedades transgénicas (PR33P67, Aristis Bt y Tietar Bt) en comparación con sus respectivas variedades isogénicas (PR33P66, Aristis y Tietar), excepto en el análisis en modo positivo de la variedad Tietar. Esto podría ser indicativo de una alteración en el metabolismo (o en algunas rutas metabólicas específicas) de las variedades transgénicas respecto a las convencionales. Las variaciones en el metabolismo de algunos OMGs con respecto a sus respectivas variedades isogénicas han sido ya previamente descritas en la bibliografía (National Research Council of the National Academies, 2004).

**Tabla 6.5.** Número de compuestos identificados tentativamente por el servidor Masstrix (Suhre y col., 2008), a partir de la base de datos KEGG, en las seis variedades de maíz (tres transgénicas Aristis Bt, Tietar Bt y PR33P67, y sus correspondientes líneas isogénicas, Aristis, Tietar y PR33P66) analizadas mediante FT-ICR-MS. Condiciones de análisis: 1000 scan (1MW) en el modo positivo y 500 scan (4MW) en el modo negativo.

	FT-ICR-MS ESI+	FT-ICR-MS ESI-
<b>PR33P66</b>	153	307
<b>PR33P67</b>	156	513
<b>TIETAR</b>	232	297
<b>TIETAR Bt</b>	111	496
<b>ARISTIS</b>	143	429
<b>ARISTIS Bt</b>	221	482

En la Figura 6.6, se muestra un diagrama de barras con el número de metabolitos identificados en algunas de las rutas metabólicas descritas en el maíz, en los dos modos de ionización estudiados, empleando el servidor Masstrix. Las tres primeras barras de cada ruta metabólica corresponden a los compuestos identificados en las variedades convencionales, mientras que las tres siguientes barras corresponden a las variedades transgénicas. Se identificaron un mayor número de metabolitos en las rutas metabólicas relacionadas con los aminoácidos, como por ejemplo el metabolismo de la tirosina y triptófano en ambos modos de ionización, o el metabolismo de lisina, fenilalanina, histidina o  $\beta$ -alanina en el modo de ionización negativo. A continuación, se estudiaron los compuestos que permitían discriminar entre las variedades transgénicas y las convencionales. Se identificaron 33 metabolitos que se detectaron en las tres variedades transgénicas y en ninguna convencional, o viceversa. Sin embargo, no todos estos compuestos pueden ser considerados biomarcadores de estas variedades transgénicas de

maíz. Esto es debido a que el servidor Masstrix asigna todos los posibles compuestos de la base de datos seleccionada a una misma fórmula molecular. Por tanto, es necesario disponer de información complementaria que permita la identificación de compuestos.



**Figura 6.6.** Número de compuestos identificados en algunas rutas metabólicas descritas en maíz, en seis variedades distintas, tres modificadas genéticamente (PR33P67, Tietar Bt y Aristis Bt) y tres variedades convencionales (PR33P66, Tietar y Aristis), mediante FT-ICR-MS en ambos modos de ionización, ESI+ (1000 scan, 1MW) y ESI- (500 scan, 4MW). Intervalo de m/z: 150 a 2000 m/z.

#### 6.4.6. Análisis comparativo de los perfiles metabólicos de maíz mediante análisis multivariante

Las diferencias en las rutas metabólicas entre las seis variedades se evaluaron mediante análisis multivariante. Se empleó el análisis discriminante sobre la regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS-DA), ya que es un método adecuado para un número pequeño de muestras (seis en este caso), respecto al número de variables (aproximadamente 5500 m/z por cada muestra). El PLS-DA es una técnica de análisis estadístico, que se suele emplear para clasificar muestras. Al aplicar esta técnica, se obtuvo como resultado la representación gráfica sobre un plano de las dos primeras componentes del PLS ( $R^2(Y)=0.99$ ;  $Q^2(\text{cum}) = 0.52$ ). El análisis discriminante se realiza mediante el estudio de la representación gráfica y las coordenadas de cada uno de los grupos (extractos de maíz, Figura 6.7A) y de las variables (m/z, Figura 6.7B) sobre el plano de las dos primeras componentes. Como se puede observar en la Figura 6.7A, la representación gráfica de los grupos sobre el plano de las dos primeras componentes permite clasificar las variedades transgénicas (en azul, situadas a la izquierda del eje en el plano) y las variedades convencionales (en rojo, situadas a la derecha del eje del plano), en función de su perfil metabolómico. La validación del modelo predictivo dio un resultado  $Q^2(\text{cum}) = 0.52$ . Sin embargo, el método no pudo validarse externamente debido al reducido número de muestras.

La gráfica de las variables sobre el plano de las dos primeras componentes representa los valores de cada una de las señales (m/z) y su correlación con los componentes del PLS (Figura 6.7B). Los valores extremos, coloreados en azul y rojo, representan las señales (m/z) que permiten diferenciar los dos grupos, en azul los m/z que caracterizan a las variedades transgénicas de maíz y en rojo las señales m/z que caracterizan a sus respectivas variedades convencionales. Los dos grupos de valores m/z discriminantes se cargaron en el servidor Masstrix para identificar los metabolitos que permiten diferenciar las muestras transgénicas de las convencionales (Figura 6.7C). El diagrama de barras de la Figura 6.7C representa el número de compuestos que permite diferenciar las variedades transgénicas (azules) y las convencionales (rojas) en cada una de las rutas metabólicas del maíz, respectivamente. Como se puede ver en esta Figura, las principales rutas metabólicas que se encuentran alteradas en las variedades transgénicas

respecto a las convencionales, son la del metabolismo del ácido araquidónico, la ruta de la fosfotransferasa (PTS) y las rutas metabólicas de la tirosina y la galactosa. Por el contrario, las rutas metabólicas principales que se encuentran alteradas en las variedades convencionales respecto a las transgénicas, son la ruta de las pentosas fosfato o el metabolismo del inositol-fosfato.

A pesar del gran potencial analítico de FT-ICR-MS para el estudio de mezclas complejas, esta técnica permite llevar a cabo únicamente la identificación de compuestos de modo tentativo. Es necesario, como se ha comentado anteriormente, disponer de más información para poder asignar un compuesto a una determinada fórmula molecular. Además, esta técnica no permite diferenciar dos compuestos isómeros que tengan la misma fórmula molecular. En consecuencia, se decidió combinar estos resultados con los obtenidos mediante otras técnicas de análisis y extracción selectivas que pudieran aportar información complementaria de utilidad en la identificación de los metabolitos.

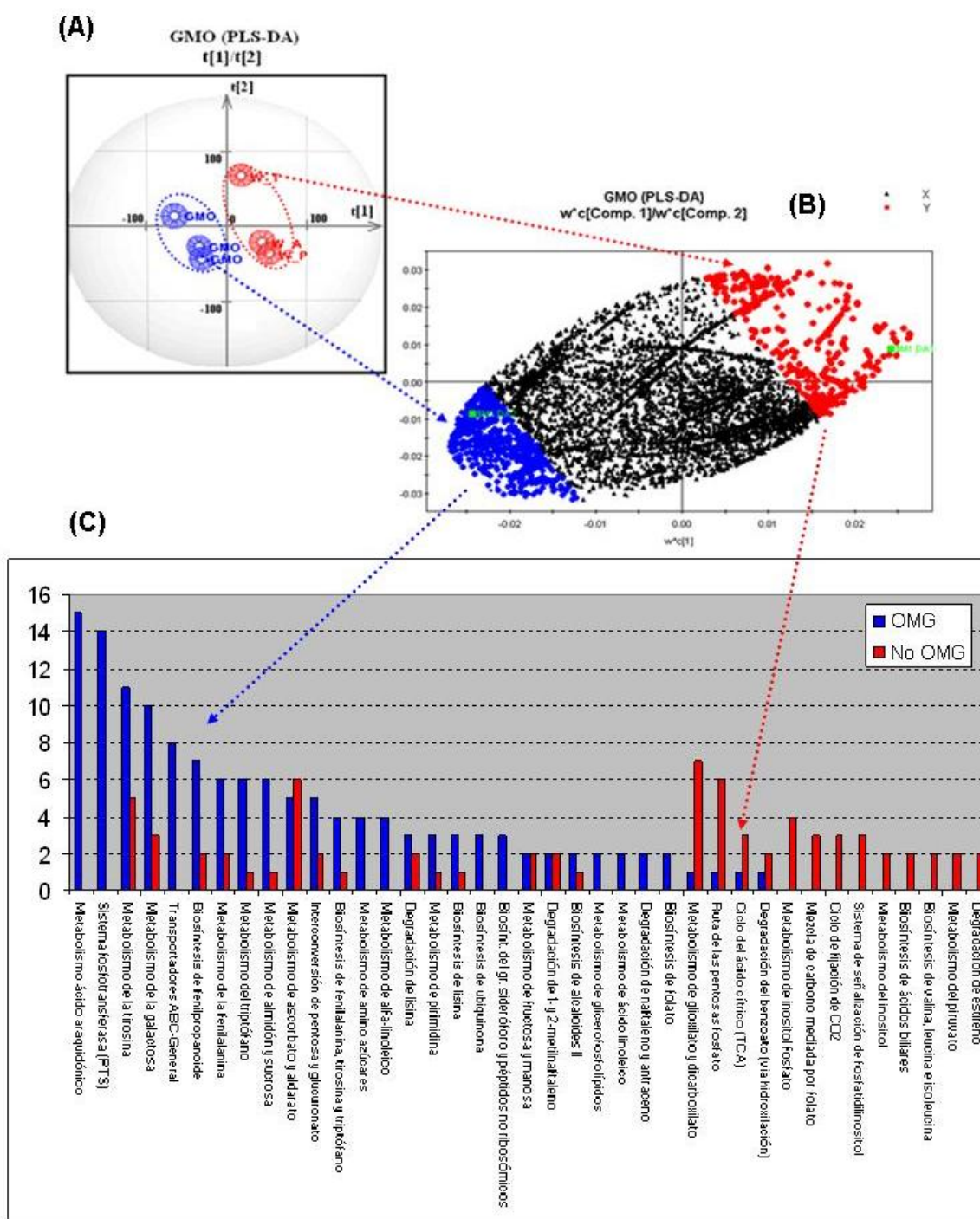


Figura 6.7. Gráficas PLS-DA ( $R^2(Y)=0.99$ ;  $Q^2(cum)=0.52$ ). El plano de las componentes del PLS-DA muestra un agrupamiento de las muestras transgénicas (azul) y de las convencionales (rojo). El modelo estadístico se realizó con los datos de  $m/z$  de las seis variedades de maíz analizadas mediante FT-ICR-MS en el modo de ionización ESI-.

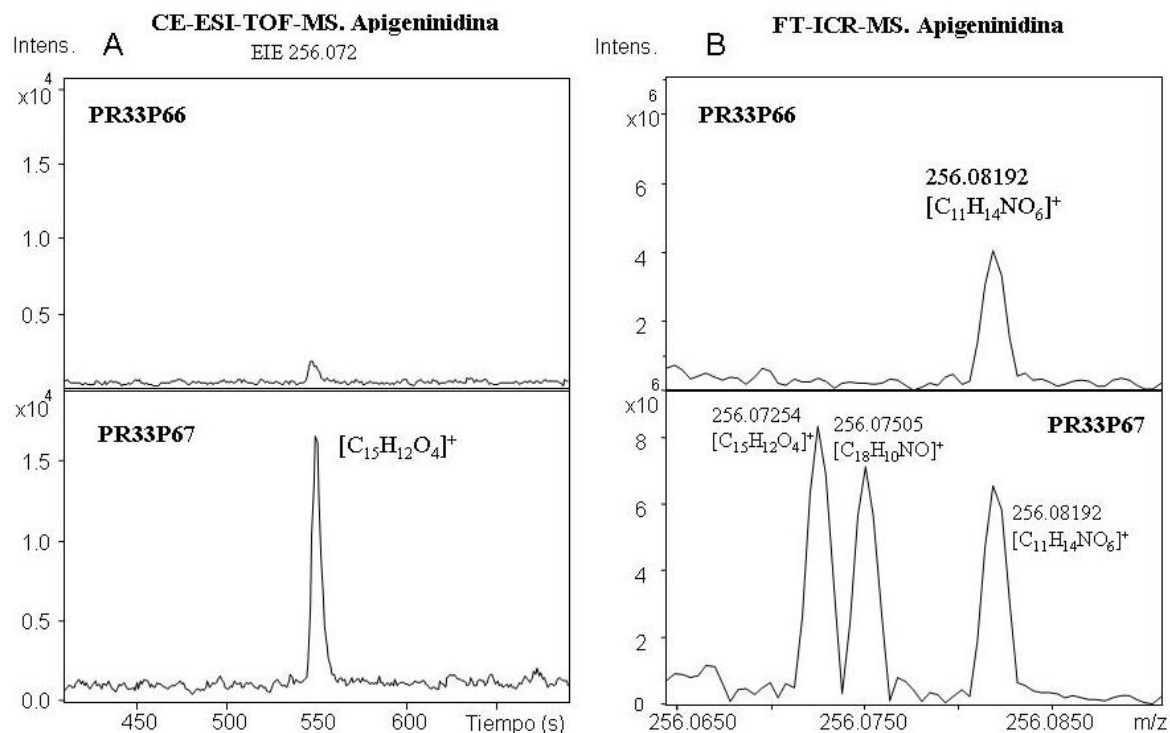
#### 6.4.7. Análisis de perfiles metabólicos en maíz transgénico y convencional mediante CE-ESI-TOF-MS y FT-ICR-MS

En esta fase del trabajo, se llevó a cabo el análisis de los perfiles metabólicos de maíz combinando los datos de masa molecular obtenidos mediante las técnicas FT-ICR-MS y CE-ESI-TOF-MS. En la Tabla 6.6 se recogen y comparan los valores de masa molecular de los compuestos identificados empleando ambas técnicas. La identificación de estos compuestos se realizó empleando la base de datos KEGG. Como se puede observar en la Tabla 6.6, hay una buena correlación entre las masas moleculares de los compuestos identificados mediante ambas técnicas y los valores teóricos. De los 11 compuestos detectados con ambas técnicas, 4 se podrían considerar biomarcadores de estas variedades de maíz, ya que se detectaron en las 3 variedades de maíz transgénico, mientras que no se detectaron en las variedades convencionales. Estos cuatro compuestos fueron: L-carnitina, apigeninidina, 5,6-dihidroxiindol y 5,6-DHET (compuestos 9, 10, 11 y 12 de la Tabla 6.6). Aunque la aplicación al análisis de mezclas complejas de las técnicas FT-ICR-MS y CE-ESI-TOF-MS de manera aislada proporciona la identificación tentativa de un número elevado de compuestos, el uso combinado de los resultados proporcionados por ambas técnicas proporciona mayor fiabilidad en la identificación de los metabolitos.

En la Figura 6.8A se muestran los electroferogramas de iones extraídos correspondientes al compuesto 10 (Tabla 6.6,  $m/z$  256.072) del análisis de maíz transgénico y convencional (PR33P67/PR33P66) mediante CE-ESI-TOF-MS y FT-ICR-MS (Figura 6.8A y 6.8B, respectivamente). Como se puede observar, independientemente de la técnica empleada, el ión 256.072 se encuentra en la variedad transgénica y no en la convencional. A este ión se le asignó la fórmula molecular  $C_{15}H_{12}O_4$ , que corresponde al metabolito apigeninidina, que interviene en la ruta metabólica de la biosíntesis de flavonoides del maíz (KEGG). La apigeninidina tiene carga positiva a pH 1.90. Como se puede observar en la Figura 6.8A, el tiempo de migración del compuesto 10, es 550 segundos, lo que confirma que el compuesto presenta carga positiva al pH empleado en la separación (1.90). En la Figura 6.8B se pueden observar otros iones, como por ejemplo el  $m/z$  256.08192, que podría ser un derivado de benzoxazinona, un metabolito del maíz (Cambier y col., 1999). Sin



embargo, este ión no se detectó mediante CE-ESI-TOF-MS, con lo que sólo se dispone de información acerca de la masa molecular, lo que no es suficiente para la identificación del compuesto.



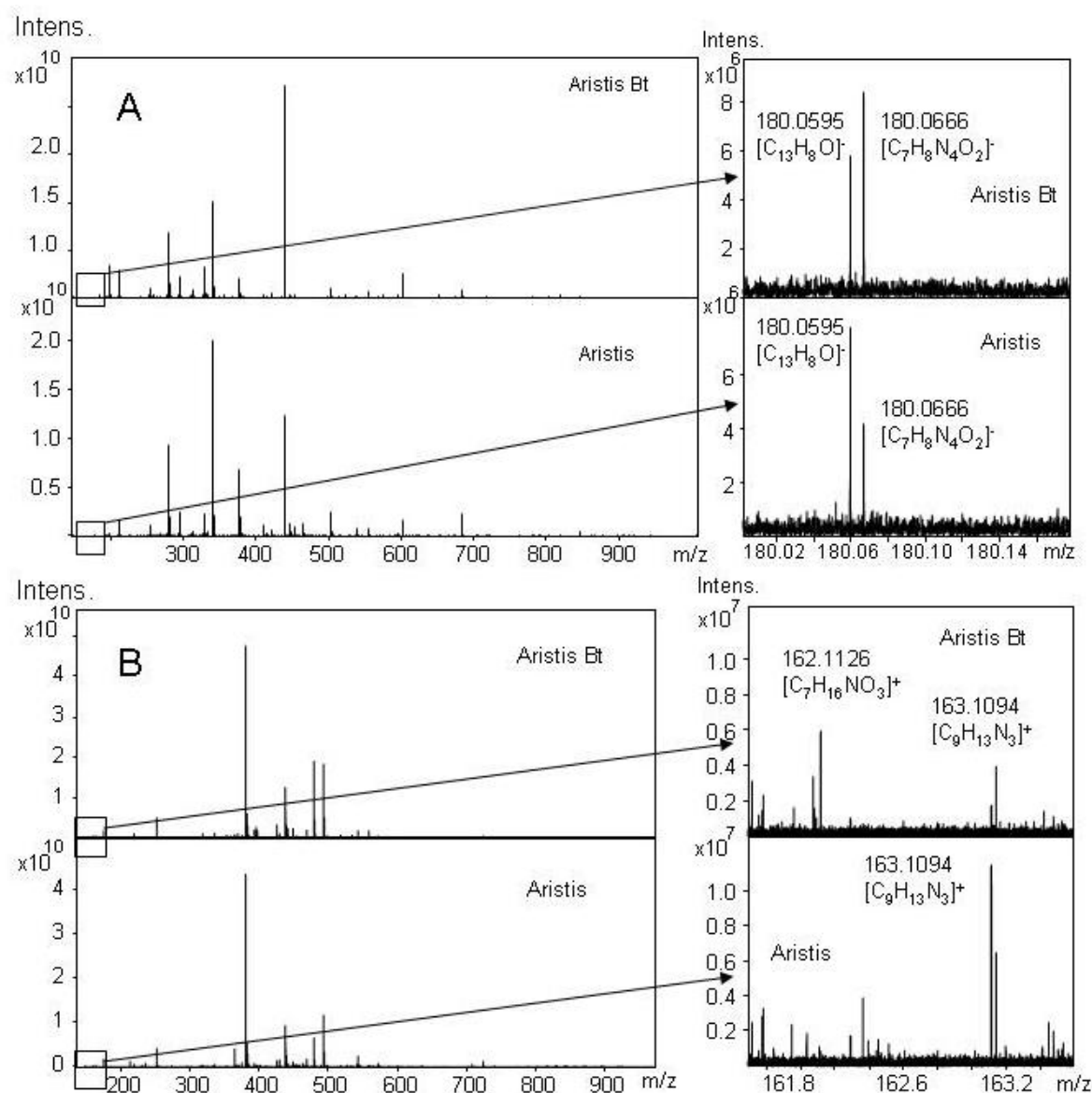
**Figura 6.8.** Comparación de los perfiles metabólicos de una variedad de maíz convencional (PR33P66) con su correspondiente variedad transgénica (PR33P67) empleando: (A) CE-ESI-TOF-MS (EIE: 256.072) y (B) FT-ICR-MS. Condiciones de análisis: (A) longitud capilar 80 cms, d.i. 50  $\mu$ m, tampón de separación, 5% ácido fórmico (pH 1.90), voltaje 20 kV, tiempo de inyección 15 seg a 0.5 psi (11nL), líquido adicional: isopropanol agua (50:50, v/v) a 0.24 mL/h, caudal gas nebulizador 0.4 bar, caudal gas de secado 4 L/min, temperatura gas secado 180°C (B) FT-ICR-MS en el modo ESI+. El resto de condiciones fueron idénticas a las de la Figura 6.6.

**Tabla 6.6.** Comparación de las masas moleculares ( $M_r$ ) obtenidas mediante CE-ESI-TOF-MS, FT-ICR-MS y las masas teóricas de los compuestos identificados. Condiciones experimentales: FT-ICR-MS en el modo positivo (1000 scan, 1MW). CE-ESI-TOF-MS: Tampón de separación 5% (v/v) ácido fórmico (pH 1.90), voltaje 20 kV, inyección 15 segundos a 0.5 psi (11 nL), líquido adicional: isopropanol:agua (50:50, v/v) a 0.24 mL/h.

Número	Fórmula molecular	$M_r$ teórico	$M_r$ FT-ICR-MS	Error FT-ICR-MS (mDa)	Error FT-ICR-MS (ppm)	$M_r$ CE-ESI-TOF-MS	Error CE-ESI-TOF-MS (mDa)	Error CE-ESI-TOF-MS (ppm)	Compuesto tentativo
1	$C_7H_{16}NO_3$	162.1124	162.1126	0.2	0.12	162.106	6.4	3.9	L-Carnitina
2	$C_6H_{15}N_4O_2$	175.1189	175.1191	0.2	0.11	175.112	6.9	3.9	Arginina
3	$C_9H_{12}NO_3$	182.0811	182.0804	0.7	0.38	182.073	8.1	4.4	Tirosina
4	$C_9H_{20}N_5O_3$	246.1561	246.1544	1.7	0.69	246.234	77.9	31.6	$\beta$ -alanin-L-arginina
5	$C_{14}H_{21}N_2O_3$	265.1546	265.1550	0.4	0.15	265.100	54.6	20.5	Subafilina
6	$C_{17}H_{14}NO_3$	280.0968	280.0924	4.4	1.57	280.084	12.8	4.6	Graveolina
7	$C_{18}H_{30}N_3O_2$	320.2332	320.2355	2.3	0.7	320.224	9.2	2.8	
8	$C_{15}H_{19}O_9$	343.1023	343.1224	19.7	5.74	343.100	2.3	0.6	1-cafeoil- $\beta$ -D-glucosa
9	$C_{25}H_{32}N_3O_4$	438.2387	438.2394	0.7	0.15	438.232	6.7	1.5	Lunarina
10	$C_{15}H_{12}O_4$	256.0730	256.0725	0.5	0.2	255.978	95	37.1	Apigeninidina
11	$C_8H_8NO_2$	150.0549	150.0528	2.1	1.39	150.065	10.1	6.7	5,6-dihidroxiindol
12	$C_{20}H_{35}O_4$	339.2529	339.2535	0.6	0.1	339.235	17.9	5.2	5,6-DHET

En la Figura 6.9 se muestran dos ejemplos adicionales del enorme potencial analítico derivado del uso combinado de CE-ESI-TOF-MS y FT-ICR-MS. El compuesto 1 (Tabla 6.6) tiene una  $m/z$  de 162.1126, que corresponde con una composición elemental  $C_7H_{16}NO_3$ , identificado tentativamente como L-carnitina. Este ión se detectó en las tres variedades de maíz transgénico, mientras que en las variedades convencionales no se detectó (Figura 6.9B). Como se ha demostrado previamente, el empleo de CE-ESI-TOF-MS permitió corroborar la presencia de L-carnitina en mayor concentración en las variedades transgénicas que en las convencionales así como su posible carácter de biomarcador de estas variedades transgénicas de maíz. Otro ejemplo se muestra en la Figura 6.9A, donde se puede ver el espectro de masas del ión 180.0666, analizado mediante FT-ICR-MS en el modo negativo. Este ión corresponde con una composición elemental  $C_9H_{10}NO_3$ , que fue identificada tentativamente como el aminoácido tirosina. Posteriormente, la movilidad electroforética de este compuesto, analizada mediante CE-ESI-TOF-MS permitió corroborar esta identificación.

Un ejemplo destacable de las ventajas de combinar la información obtenida mediante FT-ICR-MS y CE-ESI-TOF-MS es el caso del compuesto 11 (Tabla 6.6). A partir del análisis de los extractos de metabolitos mediante FT-ICR-MS en ESI+, se detectó el ión con  $m/z$  150.0528 en las tres variedades transgénicas, mientras que no se detectó en ninguna variedad convencional. Dada la gran exactitud de la masa que proporciona el equipo FT-ICR-MS, se asignó la composición elemental  $C_8H_8NO_2$  a dicho ión. Sin embargo, se observó que esta fórmula molecular podría corresponder a tres compuestos (4-hidroximandelonitrilo, 2-formilaminobenzaldehído y 5,6-dihidroxiindol). Los electroferogramas de los iones extraídos del ión con  $m/z$  150.053, obtenidos a partir del análisis de los extractos de las variedades transgénicas mediante CE-ESI-TOF-MS mostraron un único pico mientras que no se observó en ningún análisis de las variedades convencionales, corroborando nuevamente los datos obtenidos con FT-ICR-MS. Los compuestos 4-hidroximandelonitrilo y 2-formilaminobenzaldehído no presentan carga al pH empleado en la separación, con lo que no se pueden detectar mediante electroforesis capilar. En cambio, el compuesto 5,6-dihidroxiindol tiene dos anillos aromáticos y una amina secundaria que puede estar cargada positivamente a pH 1.90. Por tanto, este compuesto es el más probable de los tres candidatos. Además, el 5,6-dihidroxiindol se ha descrito en la ruta metabólica de la tirosina (KEGG), que se encuentra alterada en estas variedades de maíz transgénico.



**Figura 6.9.** Espectro de masas obtenido mediante FT-ICR-MS de los compuestos identificados tentativamente como (A) tirosina ( $m/z$  180.0666) y (B) L-carnitina ( $m/z$  162.1126), analizados en modo negativo (A) y positivo (B). El resto de condiciones experimentales fueron idénticas a las de la Figura 6.6.

Estos ejemplos demuestran que la combinación de la información obtenida mediante CE-ESI-TOF-MS y FT-ICR-MS es una buena estrategia analítica para la identificación de metabolitos. Como se ha demostrado en el ejemplo anterior y a pesar de la elevada exactitud en la determinación de la masa que proporciona FT-ICR-MS, esta técnica presenta limitaciones para la identificación en aquellos casos en los que se asignan varios compuestos a una misma fórmula molecular. Por otro lado, la movilidad electroforética del análisis CE-ESI-TOF-MS proporciona información de gran utilidad para la identificación de dichos compuestos. No obstante, CE-ESI-TOF-MS sólo

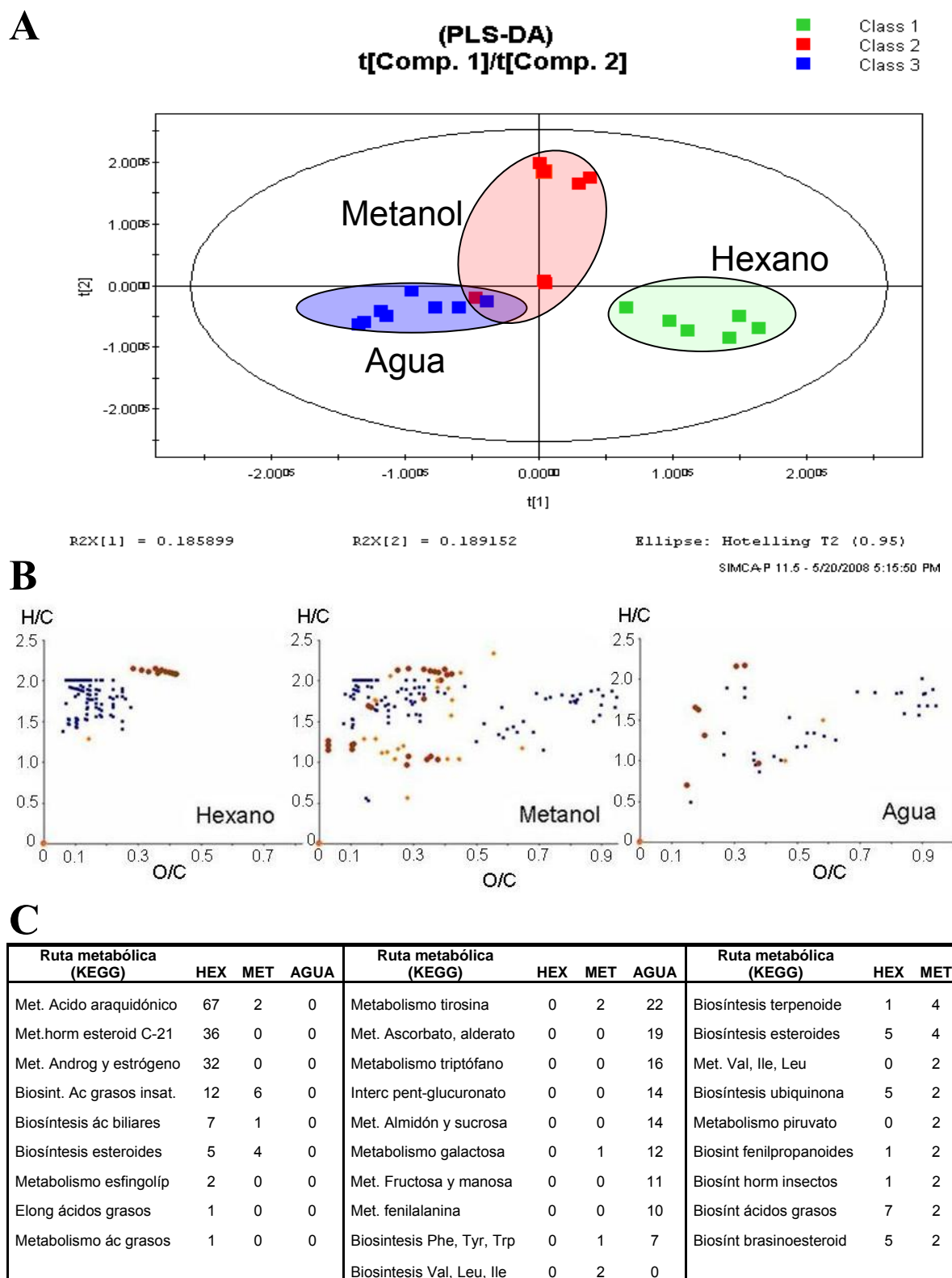
permite obtener información útil de compuestos que migren hasta el detector en las condiciones de separación seleccionadas para el análisis.

#### **6.4.8. Análisis de perfiles metabólicos en maíz transgénico y convencional mediante PLE y FT-ICR-MS**

Las condiciones de extracción pueden aportar información adicional acerca de la polaridad de los compuestos extraídos, facilitando así su posterior identificación por técnicas de espectrometría de masas. Para demostrar esta hipótesis, en la última etapa de este estudio, se empleó PLE para la extracción de los metabolitos de muestras de maíz Aristis y Aristis Bt. En las extracciones se emplearon tres disolventes de distinta polaridad (agua, metanol y hexano) a dos temperaturas diferentes (100°C y 175°C) durante 20 min a 1500 psi. A continuación, los extractos se analizaron en modo ESI-, mediante infusión directa en el equipo FT-ICR-MS.

La clasificación de las muestras a partir de los datos obtenidos se realizó mediante análisis multivariante PLS-DA. En la Figura 6.10A se muestra la representación de los grupos en el plano de las dos primeras componentes ( $R^2(Y) = 0.76$  y  $Q^2(\text{cum}) = 0.62$ ). Como se puede observar, hay un agrupamiento de las muestras en función del disolvente empleado (agua, metanol o hexano). De este análisis se deduce que el factor que tiene un efecto más acusado en los perfiles metabólicos es el disolvente de extracción, y no la temperatura o la variedad de la muestra. Se asignó una composición elemental a los valores de las variables discriminantes (valores de  $m/z$ ) responsables de este agrupamiento y se representaron en un diagrama de van Krevelen (van Krevelen, 1950) (ver Figura 6.10B). El diagrama de van Krevelen es la representación de la relación H/C de un compuesto, respecto de su relación O/C. De esta manera, los compuestos polares (con una alta relación O/C) aparecerán representados a la derecha del diagrama, mientras que los compuestos apolares (alta relación H/C y baja relación O/C), estarán representados en la parte superior izquierda del diagrama. En la Figura 6.10B, se observa que los compuestos extraídos con hexano son fundamentalmente apolares (por ejemplo lípidos, incluyendo ácidos grasos), los compuestos característicos de la extracción con agua son polares (por ejemplo carbohidratos), y los compuestos obtenidos en la extracción con metanol se encuentran más distribuidos en el diagrama

de van Krevelen. Posteriormente, se identificaron tentativamente las fórmulas moleculares de los compuestos discriminantes empleando el servidor Masstrix y se relacionaron los compuestos identificados con sus rutas metabólicas correspondientes (Figura 6.10C). Como se puede observar en la Figura 6.10C, los principales metabolitos discriminantes de la extracción con agua se encuentran principalmente en las rutas metabólicas de carbohidratos y aminoácidos (compuestos polares), mientras que los metabolitos discriminantes de la extracción con hexano están implicados en las rutas metabólicas de los ácidos grasos (compuestos no polares). Los metabolitos discriminantes de la extracción con metanol se encuentran distribuidos en varias rutas metabólicas distintas.



**Figura 6.10.** A) Representación gráfica de los grupos (extractos obtenidos con los distintos disolventes a dos temperaturas) sobre el plano de las dos primeras componentes del PLS-DA ( $R^2(Y)=0.76$ ;  $Q^2(\text{cum})=0.62$ ). B) Diagramas de van Krevelen de las composiciones elementales asignadas a las variables discriminantes (valores de m/z) de los extractos. C) Rutas metabólicas en las que intervienen los compuestos identificados a partir de las variables discriminantes de los extractos.

Dentro de cada grupo (extractos de los distintos disolventes obtenidos con dos temperaturas), las muestras se agrupan en función de la variedad (transgénica o convencional) y después en función de la temperatura de extracción, excepto en el grupo del metanol, en el que la temperatura de extracción es un factor más importante que la variedad. Esta tendencia se observa en los diagramas de van Krevelen de la Figura 6.11. En estos diagramas se representan todos los compuestos identificados mediante FT-ICR-MS y el servidor Masstrix, a partir de los extractos obtenidos mediante PLE con metanol, agua y hexano, en las dos temperaturas ensayadas (100°C y 175°C). Estos compuestos se han clasificado en función de su composición elemental (compuestos con CHO, con CHON, CHOS y CHONS). En la Tabla 6.7 se recogen los datos del número de compuestos identificados en cada una de las condiciones de extracción. Se puede observar que el agua es el disolvente que extrae un mayor número de metabolitos, mientras que el hexano es el disolvente más selectivo. En general, la temperatura también favorece una mayor extracción de metabolitos. Sin embargo, a 175 °C, la extracción con agua provoca un aumento desproporcionado de los compuestos con CHO y CHON, lo que podría indicar la aparición de productos de oxidación y compuestos de la reacción de Maillard. Esto se puede observar por el desplazamiento de la nube de puntos desde el extremo derecho (a, en la Figura 6.11), hacia el centro del diagrama (b y c, en la Figura 6.11). La extracción con metanol a 175 °C provoca un ligero aumento de los compuestos con azufre (CHOS y CHONS), mientras que la extracción con hexano no varía sustancialmente con el aumento de la temperatura.

**Tabla 6.7.** Número de metabolitos identificados en cada una de las condiciones de extracción, clasificados en función de su composición elemental. Condiciones de extracción: 20 min de extracción a la temperatura y con el disolvente especificados. Condiciones de análisis mediante FT-ICR-MS en modo ESI– (500 scan, 4MW).

	<b>Agua</b>		<b>Metanol</b>		<b>Hexano</b>	
	<b>100°C</b>	<b>175°C</b>	<b>100°C</b>	<b>175°C</b>	<b>100°C</b>	<b>175°C</b>
<b>CHO</b>	279	703	303	314	103	155
<b>CHOS</b>	113	249	133	199	26	23
<b>CHON</b>	46	284	50	48	8	12
<b>CHONS</b>	54	81	51	122	8	5



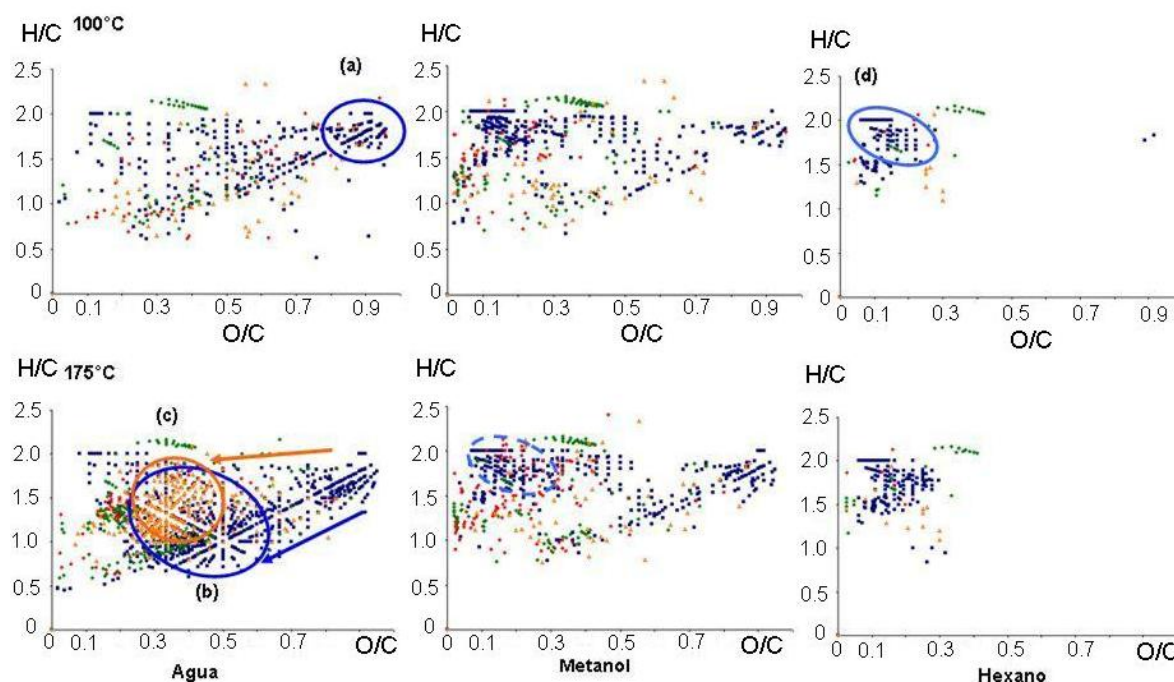


Figura 6.11. Diagramas de van Krevelen de los metabolitos de maíz extraídos mediante PLE empleando los disolventes y temperaturas indicados. (a) compuestos polares-carbohidratos, (b) condensación de carbohidratos, (c) productos de la reacción de Maillard y (d) compuestos no polares-ácidos grasos.

## 6.5. Conclusiones

El estudio de los extractos de metabolitos de maíz mediante CE-ESI-TOF-MS muestra que:

- a. La metodología basada en la técnica de análisis CE-ESI-TOF-MS desarrollada en este trabajo para el análisis de metabolitos permite obtener e identificar perfiles metabólicos complejos de maíz.
- b. La aplicación de dicha metodología permite detectar la existencia de algunas diferencias estadísticamente significativas entre las variedades transgénicas de maíz y sus respectivas variedades convencionales. En concreto, se ha demostrado que los metabolitos L-carnitina y estaquidrina, se encuentran en concentraciones más elevadas en las tres variedades transgénicas investigadas, lo que es un primer indicio de que estas sustancias podrían considerarse potenciales biomarcadores de estas variedades transgénicas de maíz.

El análisis de los extractos de metabolitos de maíz mediante PLE, FT-ICR-MS y CE-ESI-TOF-MS muestra que:

- a. El metabolismo de las variedades transgénicas de maíz estudiadas (Aristis Bt, Tietar Bt y PR33P67) muestra diferencias significativas en comparación con sus correspondientes variedades convencionales (Aristis, Tietar y PR33P66), sobre todo en algunas rutas relacionadas con el metabolismo de los aminoácidos.
- b. La combinación de la información de la movilidad electroforética de los compuestos, obtenida mediante CE-ESI-TOF-MS, junto con la gran exactitud de la masa molecular proporcionada por FT-ICR-MS es una estrategia apropiada para la identificación de metabolitos.
- c. El empleo de PLE para la extracción selectiva de metabolitos ha demostrado ser útil en estudios metabolómicos, ya que esta técnica proporciona información relevante acerca de la polaridad de los compuestos extraídos, ayudando a la identificación de los mismos.

## **CAPÍTULO VII: Conclusiones finales (Final conclusions)**



## 7. Conclusiones finales

1. Se ha desarrollado un nuevo procedimiento analítico para la detección sensible de levaduras modificadas genéticamente en muestras de vino mediante la combinación de PCR múltiple y CGE-LIF. Dicha metodología se basa en el uso combinado de PVPP y un kit comercial, para la obtención de extractos de ADN de levadura con calidad y rendimiento adecuados para su amplificación por PCR a partir de muestras de vino. La aplicación de dicha metodología permitió detectar de manera específica la presencia de la cepa transgénica EKD-13 de *S. cerevisiae* en muestras de vino.
2. Se ha llevado a cabo el análisis del grupo de proteínas zeínas en muestras de maíz mediante CE-ESI-TOF-MS y CE-ESI-IT-MS. Ambos métodos presentan límites de detección y reproducibilidad similares. El método de análisis mediante CE-ESI-TOF-MS permite detectar un mayor número de proteínas que el método CE-ESI-IT-MS. Esto puede deberse a que la variación de los parámetros instrumentales afecta más a la detección de las proteínas mediante CE-ESI-IT-MS que mediante CE-ESI-TOF-MS. La aplicación de estas metodologías al análisis de los perfiles proteicos correspondientes a las zeínas en extractos de maíz convencional y transgénico no detectó ninguna diferencia significativa entre ambas muestras.
3. Se ha realizado un análisis comparativo del potencial de tres ciclodextrinas modificadas (CDen, CDampy y CD3NH<sub>2</sub>) para la separación quiral de aminoácidos mediante CE-LIF y CE-MS. A partir de los resultados obtenidos mediante CE-LIF con una mezcla patrón de aminoácidos, se ha desarrollado un método de análisis de aminoácidos quirales en extractos de vinagre y soja mediante CE-ESI-TOF-MS. La baja concentración de la ciclodextrina modificada en el tampón de separación, permite el análisis directo de las muestras. La aplicación de la metodología desarrollada al análisis de soja convencional y transgénica permite determinar pequeñas variaciones entre las fracciones de aminoácidos quirales en ambas muestras.
4. Se ha desarrollado una metodología de análisis de perfiles metabólicos complejos en soja mediante CE-ESI-TOF-MS. La aplicación de dicha metodología permitió detectar e identificar más de 40 metabolitos, como isoflavonas, aminoácidos, ácidos carboxílicos y

péptidos en muestras de soja. Además, se detectó la existencia de algunas diferencias entre la variedad transgénica de soja RR y su correspondiente variedad convencional. Así, se detectó el metabolito 4-hidroxi-L-treonina en la variedad convencional de soja y no se detectó en la variedad transgénica, lo que es un primer indicio para considerar este compuesto como un potencial biomarcador de esta variedad de soja. Sin embargo, para poder confirmar este punto es necesario disponer y analizar un mayor número de muestras.

5. Se ha desarrollado una metodología para el análisis de perfiles metabólicos complejos en maíz basada en CE-ESI-TOF-MS. La aplicación de dicha metodología permitió detectar la existencia de algunas diferencias estadísticamente significativas entre las variedades transgénicas de maíz y sus respectivas variedades convencionales. En concreto, se ha demostrado que los metabolitos L-carnitina y estaquidrina, se encuentran en concentraciones más elevadas en las tres variedades transgénicas investigadas, lo que es un primer indicio de que estas sustancias podrían considerarse potenciales biomarcadores de estas variedades transgénicas de maíz.

6. Se ha realizado un estudio metabolómico de las variedades transgénicas de maíz Aristis Bt, Tietar Bt y PR33P67 y de sus correspondientes variedades convencionales (Aristis, Tietar y PR33P66) mediante la combinación de la información obtenida con CE-ESI-TOF-MS y FT-ICR-MS. Dicho estudio muestra diferencias en el metabolismo de las variedades transgénicas en comparación con sus variedades convencionales, sobre todo en algunas rutas relacionadas con el metabolismo de los aminoácidos. Se ha demostrado que el empleo de PLE para la extracción selectiva de metabolitos es una técnica útil en estudios metabolómicos, ya que proporciona información relevante acerca de la polaridad de los compuestos extraídos, ayudando a la identificación de los mismos.

## Final conclusions

1. A new multiplex PCR-CGE-LIF method has been developed for the detection of recombinant yeasts in wine samples. The methodology is based on the combination of a commercial kit and PVPP for the extraction of PCR-quality yeast DNA from wine samples. The usefulness of this PCR-CGE-LIF method was demonstrated through the fast and sensitive detection of the genetically modified EKD-13 *S. cerevisiae* strain in different wine samples. This new methodology can be suitable for the detection of other GM yeasts in wine samples.
2. The analysis of entire zein proteins in maize samples with two hyphenated systems, CE-ESI-IT-MS and CE-ESI-TOF-MS, was carried out. Performance in terms of peak area reproducibility and LOD was similar for both instruments. The results show that CE-ESI-TOF-MS allows the identification of a higher number of proteins than CE-ESI-IT-MS. This can be due to the variation of instrumental parameters that affects more to the detection of proteins in CE-ESI-IT-MS than in CE-ESI-TOF-MS. The application of both methodologies to the analysis of protein profiles from conventional and transgenic maize did not show significant differences.
3. A comparative analysis of three modified cyclodextrines (mCDs) for the separation of chiral aminoacids with CE-LIF has been carried out. Based on the CE-LIF results, a new chiral CE-ESI-TOF-MS method has been developed in which mCDs are added to the BGE and infused into the interface at very low concentrations. The sensitivity of the chiral CE-ESI-TOF-MS method is comparable to that achieved by CE-LIF (i.e., in the nM range). The usefulness of this chiral CE-ESI-TOF-MS method has been demonstrated through the analysis of conventional and genetically modified soybean, allowing the detection of unexpected modifications in their aminoacid profile.
4. A complete analytical method for the analysis of complex metabolic profiles in soybean samples has been developed using CE-ESI-TOF-MS. This method allows the tentative identification of more than 40 compounds, including, isoflavones, aminoacids, carboxylic acids and peptides. A comparative study between the metabolic profile of conventional and genetically modified Roundup Ready<sup>TM</sup> (RR) soybean was carried out

with this methodology. The results show that some of the detected metabolites have significant quantitative differences in their intensities between the conventional and transgenic soybean. For instance, a compound tentatively identified as 4-hydroxy-L-threonine was not detected in the transgenic soybean compared to its parental non-transgenic line. The selection of metabolites as possible biomarkers of transgenic soybean is discussed, although a larger number of samples need to be analyzed in order to confirm this point.

5. A new CE-ESI-TOF-MS methodology for the analysis of complex metabolic profiles in maize samples has been developed. The application of this methodology allowed the detection of significant quantitative differences between three transgenic maize varieties (Aristis Bt, PR33P67 and Tietar Bt) and their isogenic non transgenic lines (Aristis, PR33P66 and Tietar). For instance, it was demonstrated that two metabolites, tentatively identified as L-carnitine and stachydrine, showed higher concentration in all the transgenic samples than in their conventional counterparts. Therefore, these metabolites could be considered as possible biomarkers of transgenic maize. However, to confirm this point, a larger number of samples should be analyzed.

6. A metabolomic study, based on the combination of the information provided by CE-ESI-TOF-MS and FT-ICR-MS, in transgenic (Aristis Bt, PR33P67 and Tietar Bt) and conventional (Aristis, PR33P66 and Tietar) maize samples, has been carried out. The results showed significant differences in the metabolism of transgenic samples compared to conventional samples, especially for some aminoacid related pathways. It was also demonstrated that PLE is a useful extraction technique in metabolomic studies, as it provides valuable information on the polarity of compounds, which can be used as an additional data for metabolite identification.



## **BIBLIOGRAFÍA**



## BIBLIOGRAFÍA

- Albo, A.G., Mila, S., Digilio, G., Motto, M., Aime, S., Corpillo, D. 2007. Proteomic analysis of a genetically modified maize flour carrying Cry1Ab gene and comparison to the corresponding wild-type. *Maydica* 52, 443-455.
- Ali, S., Zafar, Y., Xianyin, Z., Ali, G.M., Jumin, T. 2008. Transgenic crops: Current challenges and future perspectives. *Afr. J. Biotechnol.* 7, 4667-4676.
- Ashburner, M., Ball, C.A., Blake, J.A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J.M., Davis, A.P., Dolinski, K., Dwight, S.S., Eppig, J.T., Harris, M.A., Hill, D.P., Issel-Tarver, L., Kasarskis, A., Lewis, S., Matese, J.C., Richardson, J.E., Ringwald, M., Rubin, G.M., Sherlock, G. (The Gene Ontology Consortium). 2000. Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nat. Genet.* 25, 25-29.
- Aussenac, T., Lacombe, S., Dayde, J. 1998. Quantification of isoflavones by capillary zone electrophoresis in soybean seeds: Effects of variety and environment. *Am. J. Clin. Nutr.* 68, 1480S-1485S.
- Babekova, R., Funk, T., Pecoraro, S., Engel, K-H., Busch, U. 2009. Development of an event-specific Real-time PCR detection method for the transgenic Bt rice line KMD1. *Eur. Food Res. Technol.* 228, 707-716.
- Baggett, B.R., Cooper, J.D., Hogan, E.T., Carper, J., Paiva, N.L., Smith, J.T. 2002. Profiling isoflavonoids found in legume root extracts using capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 23, 1642-1651.
- Bairoch, A., Apweiler, R. 1997. The SWISS-PROT protein sequence database: Its relevance to human molecular medical research. *J. Molec. Med.* 75, 312-316.
- Baleiras-Couto, M.M., Eiras-Dias, J.E. 2006. Detection and identification of grape varieties in must and wine using nuclear and chloroplast microsatellite markers. *Anal. Chim. Acta* 563, 283-291.
- Baudo, M.M., Lyons, R., Powers, S., Pastori, G.M., Edwards, K.J., Holdsworth, M.J., Shewry, P.R. 2006. Transgenesis has less impact on the transcriptome of wheat grain than conventional breeding. *Plant Biotechnol. J.* 4, 369-380.
- Bean, S.R., Lookhart, G.L., Bietz, J.A. 2000. Acetonitrile as a buffer additive for free zone capillary electrophoresis separation and characterization of maize (*Zea mays* L.) and Sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) storage proteins. *J. Agr. Food Chem.* 48, 318-327.
- Benson, D.A., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D.J., Ostell, J., Wheeler, D.L. 2008. Genbank. *Nucl. Ac. Res.* 36, D25-D30.
- Bernal, J.L., Nozal, M.J., Toribio, L., Diego, C., Mayo, R., Maestre, R. 2008. Use of supercritical fluid extraction and gas chromatography-mass spectrometry to obtain amino acid profiles from several genetically modified varieties of maize and soybean. *J. Chromatogr. A* 1192, 266-272.

- Bianco, G., Schmitt-Kopplin, P., Crescenzi, A., Comes, S., Kettrup, A., Cataldi, T.R.I. 2003. Evaluation of glycoalkaloids in tubers of genetically modified virus Y-resistant potato plants (var. De'sire'e) by non-aqueous capillary electrophoresis coupled with electrospray ionization mass spectrometry (NACE-ESI-MS). *Anal. Bioanal. Chem.* 375, 799-804.
- Bolton, E., Wang, Y., Thiessen, P.A., Bryant, S.H. 2008. PubChem: Integrated Platform of Small Molecules and Biological Activities. *Ann. R. Comput. Chem.* 4, 217-241.
- Bonomo, R.P., Cucinotta, V., D'Alessandro, F., Impellizzeri, G., Maccarrone, G., Vecchio, G., Rizzarelli, E. 1991. Conformational features and coordination properties of functionalized cyclodextrins. Formation, stability, and structure of proton and copper(II) complexes of histamine-bearing  $\beta$ -cyclodextrin in aqueous solution. *Inorg. Chem.* 30, 2708-2713.
- Bunz, S.C., Weinmann, W., Neusüß, C. 2010. The selective determination of sulfates, sulfonates and phosphates in urine by CE-MS. *Electrophoresis* 31, 1274-1281.
- Burns, M., Valdivia, H. 2008. Modelling the limit of detection in real-time quantitative PCR. *Eur. Food. Res. Technol.* 226, 1513-1524.
- Cambier, V., Hance, T., De Hoffmann, E. 1999. Non-injured maize contains several 1,4-benzoxazin-3-one related compounds but only as glucoconjugates. *Phytochem. Anal.* 10, 119-126.
- Careri, M., Elviri, L., Mangia, A., Zagnoni, I., Agrimonti, C., Visioli, G., Marmiroli, N. 2003. Analysis of protein profiles of genetically modified potato tubers by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid. Commun. Mass. Sp.* 17, 479-483.
- Carlavilla, D., Moreno-Arribas, M.V., Fanali, S., Cifuentes, A. 2006. Chiral MEKC-LIF of amino acids in foods: Analysis of vinegars. *Electrophoresis* 27, 2551- 2557.
- Carpentier, S.C., Panis, B., Vertommen, A., Swennen, R., Sergeant, K., Renaut, J., Laukens, K., Witters, E., Samyn, B., Devreese, B. 2008. Proteome analysis of non-model plants: A challenging but powerful approach. *Mass Spectrom. Rev.* 27, 354-377.
- Castro, C., Manetti, C. 2007. A multiway approach to analyze metabonomic data: a study of maize seeds development. *Anal. Biochem.* 371, 194-200.
- Catchpole, G.S., Beckmann, M., Enot, D.P., Mondhe, M., Zywicki, B., Taylor, J., Hardy, N., Smith, A., King, R.D., Kell, D.B., Fiehn, O., Draper, J. 2005. Hierarchical metabolomics demonstrates substantial compositional similarity between genetically modified and conventional potato crops. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 14458-14462.
- Cavaliere, C., Cucci, F., Foglia, P., Guarino, C., Samperi, R., Laganá, A. 2007. Flavonoid profile in soybeans by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21, 2177-2187.

- Cebollero, E., González-Ramos, D., Tabera, L., Gonzalez, R. 2007. Transgenic wine yeast technology comes of age: Is it time for transgenic wine? *Biotechnol. Lett.* 29, 191-200.
- Cebollero, E., Martinez-Rodríguez, A., Carrascosa, A.V., Gonzalez, R. 2005. Overexpression of *csc1-1*. A plausible strategy to obtain wine yeast strains undergoing accelerated autolysis. *FEMS Microbiol. Lett.* 246, 1-9.
- Cellini, F., Chesson, A., Colquhoun, I., Constable, A., Davies, H.V., Engel, K.H., Gatehouse, A.M.R., Karenlampi, S., Kok, E.J., Leguay, J.J., Lehesranta, S., Noteborn, H.P.J.M., Pedersen, J., Smith, M. 2004. Unintended effects and their detection in genetically modified crops. *Food Chem. Toxicol.* 42, 1089-1125.
- CERA. 2010. GM Crop Database. Center for Environmental Risk Assessment (CERA), ILSI Research Foundation, Washington D.C. [http://cera-gmc.org/index.php?action=gm\\_crop\\_database](http://cera-gmc.org/index.php?action=gm_crop_database)
- Chen, G., Pramanik, B.N. 2009. Application of LC/MS to proteomics studies: current status and future prospects. *Drug Discov. Today* 14, 465-471
- Chen, J., Zhao, X., Fritsche, J., Yin, P., Schmitt-Kopplin, P., Wang, W., Lu, X., Haring, H.U., Schleicher, E.D., Lehmann, R., Xu, G. 2008. Practical approach for the identification and isomer elucidation of biomarkers detected in a metabonomic study for the discovery of individuals at risk for diabetes by integrating the chromatographic and mass spectrometric information. *Anal. Chem.* 80, 1280-1289.
- Cifuentes, A. 2006. Recent advances in the application of capillary electromigration methods for food analysis. *Electrophoresis* 27, 283-303.
- Clayton, T.A., Lindon, J.C., Cloarec, O., Antti, H., Charuel, C., Hanton, G., Provost, J.P., Net, J.L.L., Baker, D., Walley, R.J., Everett, J.R., Nicholson, J.K. 2006. Pharmaco-metabonomic phenotyping and personalized drug treatment. *Nature* 440, 1073-1077.
- Cohen, S.N., Chang, A.C.Y., Boyer, H.W., Helling, R.B. 1973. Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 70, 3240-3244.
- Coll, A., Nadal, A., Collado, R., Capellades, G., Kubista, M., Messeguer, J., Pla, M. 2010. Natural variation explains most transcriptomic changes among maize plants of MON810 and comparable non-GM varieties subjected to two N-fertilization farming practices. *Plant Mol. Biol.* 73, 349-362.
- Coll, A., Nadal, A., Collado, R., Capellades, G., Messeguer, J., Melé, E., Palaudemas, M., Pla, M. 2009. Gene expression profiles of MON810 and comparable non-GM maize varieties cultured in the field are more similar than are those of conventional lines. *Transgenic Res.* 18, 801-808.
- Coll, A., Nadal, A., Palaudemas, M., Messeguer, J., Melé, E., Puigdomenech, P., Pla, M. 2008. Lack of repeatable differential expression patterns between MON810 and comparable commercial varieties of maize. *Plant Mol. Biol.* 68, 105-117.

- Coon, J.J., Zürbig, P., Dakna, M., Dominiczak, A.F., Decramer, S., Fliser, D., Frommberger, M., Golovko, I., Good, D.M., Herget-Rosenthal, S., Jankowski, J., Julian, B.A., Kellmann, M., Kolch, W., Massy, Z., Novak, J., Rossing, K., Schanstra, J.P., Schiffer, E., Theodorescu, D., Vanholder, R., Weissinger, E.M., Mischak, H., Schmitt-Kopplin, P. 2008. CE-MS analysis of the human urinary proteome for biomarker discovery and disease diagnostics. *Proteom. Clin. Appl.* 2, 964-973.
- Corpillo, D., Gardini, G., Vaira, A.M., Basso, M., Aime, S., Accotto, G.P., Fasano, M. 2004. Proteomics as a tool to improve investigation of substantial equivalence in genetically modified organisms: The case of a virus resistant tomato. *Proteomics* 4, 193-200.
- Coulon, J., Husnik, J.I., Inglis, D.L., Van Der Merwe, G.K., Lonvaud, A., Erasmus, D.J., Van Vuuren, H.J.J. 2006. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* to minimize the production of ethyl carbamate in wine. *Am. J. Enol. Viticult.* 57, 113-124.
- Craig, W., Tepfer, M., Degrassi, G., Ripandelli, D. 2008. An overview of general features of risk assessments of genetically modified crops. *Euphytica* 164, 853-880.
- Cucinotta, V., Giuffrida, A., Grasso, G., Maccarrone, G., Mazzaglia, A., Vecchio, G. 2001. New cyclodextrin derivatives as chiral selectors in capillary electrophoresis. *Anal. Bioanal. Chem.* 370, 363-366.
- Cucinotta, V., Giuffrida, A., Grasso, G., Maccarrone, G., Messina, M., Vecchio, G. 2007. High selectivity in new chiral separations of dansyl amino acids by cyclodextrin derivatives in electrokinetic chromatography. *J. Chromatogr. A* 1155, 172-179.
- Cuyckens, F., Claeys, M. J. 2004. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *J. Mass Spectrom.* 39, 1-15.
- De Block, M., Botterman, J., van Dewiele, M., Dockx, J., Thoen, C., Goseele, V., Movva, N.R., Thompson, C., Van Montagu, M., Leemans, J. 1987. Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme. *EMBO J.* 6, 2513-2518.
- De la Garza, R.I.D., Gregory III, J.F., Hanson, A.D. 2007 Folate biofortification of tomato fruit. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 4218-4222.
- Di Carli, M., Villani, M.E., Renzone, G., Nardi, L., Pasquo, A., Franconi, R., Scaloni, A., Benvenuto, E., Desiderio, A. 2009. Leaf proteome analysis of transgenic plants expressing antiviral antibodies. *J. Proteome Res.* 8, 838-848.
- Di Luccia, A., Lamacchia, C., Fares, C., Padalino, L., Mamone, G., La Gatta, B., Gambacorta, G., Faccia, M., Di Fonzo, N., La Notte, E. 2005. A proteomic approach to study protein variation in GM durum wheat in relation to technological properties of semolina. *Ann. Chim. Rome* 95, 405-414.

- Directiva 2001/18/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 12 de marzo de 2001 sobre la liberación intencional en el medio ambiente de organismos modificados genéticamente. Diario Oficial de las Comunidades Europeas, 17.4.2002, L106/1.
- Directiva 2009/41/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 6 de mayo de 2009 relativa a la utilización confinada de microorganismos modificados genéticamente. Diario Oficial de las Comunidades Europeas, 21.5.2009, L125/75.
- Domingo, J.L. 2007. Toxicity studies of genetically modified plants: A review of the published literature. *Crit. Rev. Food Sci.* 47, 721-733.
- Dubouzet, J.G., Ishihara, A., Matsuda, F., Miyagawa, H., Iwata, H., Wakasa, K. 2007 Integrated metabolomic and transcriptomic analyses of high-tryptophan rice expressing a mutant anthranilate synthase alpha subunit. *J. Exp. Bot.* 58, 3309-3321.
- Duke, J. A. 1992. Handbook of phytochemical constituents of GRAS herbs and other economic plants. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Dumas, M.E., Maibaum, E.C., Teague, C., Ueshima, H., Zhou, B., Lindon, J.C., Nicholson, J.K., Stamler, J., Elliot, P., Chan, Q., Holmes, E. 2006. Assessment of analytical reproducibility of 1H NMR spectroscopy based metabonomics for large-scale epidemiological research: The INTERMAP study. *Anal Chem.* 78, 2199-2208.
- EFSA. 2006. Guidance document of the scientific panel on genetically modified organisms for the risk assessment of genetically modified plants and derived food and feed. EFSA Communications Department, Parma, Italy.
- Eglinton, J. M., Heinrich, A.J., Pollnitz, A.P., Langridge, P., Henschke, P.A., de Barros-Lopes, M. 2002. Decreasing acetic acid accumulation by a glycerol overproducing strain of *Saccharomyces cerevisiae* by deleting the ALD6 aldehyde dehydrogenase gene. *Yeast* 19, 295-301.
- Eisenber, M. A., Maseda, R., Star, C. 1968. 7-Keto-8-aminopelargonic acid an early intermediate in biotin biosynthesis. *Fed. Proc.* 27, 762.
- Erny, G.L., Cifuentes, A. 2006. Liquid separation techniques coupled with mass spectrometry for chiral analysis of pharmaceuticals compounds and their metabolites in biological fluids. *J. Pharmaceut. Biomed.* 40, 509-515.
- Erny, G.L., Marina, M.L., Cifuentes, A. 2007. CE-MS of zein proteins from conventional and transgenic maize. *Electrophoresis* 28, 4192-4201.
- EU tender No. XXIV/98/A3/001. Development of qualitative as well as quantitative detection methods to identify a genetic modification in soybean and maize productions.  
[http://ec.europa.eu/food/food/biotechnology/gmfood/biotech05\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/food/biotechnology/gmfood/biotech05_en.pdf)

- FDA GRAS Notice 000120. 2003. Lesaffre Yeast Corporation. GRAS notification for the use of a modified yeast strain in winemaking
- FDA GRAS Notice 000175. 2005. First Venture Technologies Corporation. GRAS Notification for the use of a modified yeast for reduction of ethyl carbamate in fermented beverages.
- Fenn, J.B., Mann, M., Meng, C.K., Wong, S.K., Whitehouse, C.M. 1989. Electron spray ionization of large biomolecules. *Science* 246, 64-161.
- Fernández-Ocaña, M., Fraser, P., Patel, R.K.P., Halket, J.M., Bramley, P.M. 2007. Mass spectrometric detection of CP4 EPSPS in genetically modified soya and maize. *Rapid Commun. Mass Sp.* 21, 319-328.
- Fiehn, O. 2001. Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modelling to understand metabolic networks. *Compar. Funct. Genom.* 2, 155-168.
- Flachowsky, G., Chesson, A., Aulrich, K. 2005. Animal nutrition with feeds from genetically modified plants. *Arch. Anim. Nutr.* 59, 1-40.
- Freeman, W.M., Walker, S.J., Vrana, K.E. 1999. Quantitative RT-PPCR: Pitfalls and potential. *Biotechniques* 26, 112-125.
- Frewer, L., Lassen, J., Kettlitz, B., Scholderer, J., Beekman, V., Berdal, K.G. 2004. Societal aspects of genetically modified foods. *Food Chem. Toxicol.* 42, 1181-1193.
- Ganga, M.A., Pinaga, F., Valles, S., Ramon, D., Querol, A. 1999. Aroma improving in microvinification processes by the use of a recombinant wine yeast strain expressing the *Aspergillus nidulans* xlnA gene. *Int. J. Food Microbiol.* 47, 171-178.
- Gao, A.G., Hakimi, S.M., Mittanck, C.A., Wu, Y., Woerner, H., Stark, D.H., Shah, D.H., Liang, J., Tommens, C.M. 2000. Fungal pathogen protection in potato by expression of a plant defensin peptide. *Nat. Biotech.* 18, 1307-1310.
- García, M.C., García, B., García-Ruiz, C., Gómez, A., Cifuentes, A., Marina, M.L. 2009. Rapid characterisation of (glyphosate tolerant) transgenic and non-transgenic soybeans using chromatographic protein profiles. *Food Chem.* 113, 1212-1217.
- García-Cañas, V., Cifuentes, A. 2007. Detection of microbial food contaminants and their products by capillary electromigration techniques. *Electrophoresis* 28, 4013-4030.
- García-Cañas, V., Cifuentes, A. 2008a. Recent advances in the application of capillary electromigration methods for food analysis. *Electrophoresis* 29, 294-309.
- García-Cañas, V., Cifuentes, A. 2008b. Simultaneous confirmatory analysis of different transgenic maize (*zea mays*) lines using multiplex polymerase chain reaction-restriction analysis and capillary gel electrophoresis with laser induced fluorescence detection. *J. Agr. Food Chem.* 56, 8280-8286.



- García-Cañas, V., Cifuentes, A., González, R. 2004a. Detection of genetically modified organisms in foods by DNA amplification techniques. *Crit. Rev. Food Sci.* 44, 425-436.
- García-Cañas, V., Cifuentes, A., González, R. 2004b. Quantitation of transgenic Bt event-176 maize using double quantitative competitive polymerase chain reaction and capillary electrophoresis laser-induced fluorescence. *Anal. Chem.* 76, 2306–2313.
- García-Cañas, V., González, R., Cifuentes, A. 2002a. Detection of genetically modified maize by the polymerase chain reaction and capillary gel electrophoresis with UV detection and laser-induced fluorescence. *J. Agr. Food Chem.* 50, 1016-1021.
- García-Cañas, V., González, R., Cifuentes, A. 2002b. Ultrasensitive detection of genetically modified maize DNA by capillary gel electrophoresis with laser-induced fluorescence using different fluorescent intercalating dyes. *J. Agr. Food Chem.* 50, 4497-4502.
- García-Cañas, V., González, R., Cifuentes, A. 2004c. Sensitive and simultaneous analysis of five transgenic maizes using multiplex polymerase chain reaction, capillary gel electrophoresis, and laser-induced fluorescence. *Electrophoresis* 25, 2219–2226.
- García-Cañas, V., González, R., Cifuentes, A. 2004d. The combined use of molecular techniques and capillary electrophoresis in food analysis. *TRAC – Trends Anal. Chem.* 23, 637-643.
- García-Cañas, V., Mondello, M., Cifuentes, A. 2010. Simultaneous detection of genetically modified organisms by multiplex ligation-dependent genome amplification and capillary gel electrophoresis with laser-induced fluorescence. *Electrophoresis* 31, 2249-2259.
- García-Ruiz, C., García, M.C., Cifuentes, A., Marina, M.L. 2007. Characterization and differentiation of diverse transgenic and nontransgenic soybean varieties from CE protein profiles. *Electrophoresis* 28, 2314-2323.
- Garza, C., Stover, P. 2003. General introduction: The role of science in identifying common ground in the debate on genetic modification of foods. *Trends Food Sci. Technol.* 14, 182-190.
- Gelpí, E. 2002. Interfaces for coupled liquid-phase separation/mass spectrometry techniques. An update on recent developments. *J. Mass Spectrom.* 37, 241-253.
- Gisbert, C., Rus, A.M., Bolarín M.C., López-Coronado, J.M., Arrillaga, I., Montesinos, C., Caro, M., Serrano, R., Moreno, V. 2000. The yeast HAL1 gene improves salt tolerance of transgenic tomato. *Plant Physiol.* 123, 393-402.
- González, N., Elvira, C., San Román, J. 2003. Hydrophilic and hydrophobic copolymer systems based on acrylic derivatives of pyrrolidone and pyrrolidine. *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.* 41, 395- 407.

- González-Ramos, D., Cebollero, E., Gonzalez, R. 2008. A recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strain overproducing mannoproteins stabilizes wine against protein haze. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 5533-5540.
- González-Ramos, D., Quiros, M., Gonzalez, R. 2009. Three different targets for the genetic modification of wine yeast strains resulting in improved effectiveness of bentonite fining. *J. Agr. Food Chem.* 57, 8373-8378.
- Grard, S., Morin, P., Dreux, M., Ribet, J.P. 2001. Efficient applications of capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry to the analysis of adrenoreceptor antagonist enantiomers using a partial filling technique. *J. Chromatogr. A* 926, 3-10.
- Gregersen, P.L., Brinch-Pedersen, H., Holm, P.B. 2005. A microarraybased comparative analysis of gene expression profiles during grain development in transgenic and wild type wheat. *Transgenic Res.* 14, 887-905.
- Hails, R.S. 2000. Genetically modified plants-The debate continues. *Trends Ecol. Evol.* 15, 14-18.
- Harada, K., Fukusaki, E. 2009. Profiling of primary metabolite by means of capillary electrophoresis-mass spectrometry and its application for plant science. *Plant Biotechnol.* 26, 47-52.
- Harborne, J. B., Baxter, H. 1983. A Handbook of Bioactive Compounds from Plants. In: *Phytochemical Dictionary*. Taylor & Frost, London.
- Harikai, N., Saito, S., Tanaka, A., Kinoshita, K. 2009. Determination of unprocessed genetically modified soybean in foods using simplex and duplex real-time PCR with an internal standard. *Int. J. Food Sci. Technol.* 44, 1778-1785.
- Haselberg, R., de Jong, G.J., Somsen, G.W. 2007. Capillary electrophoresis-mass spectrometry for the analysis of intact proteins. *J. Chromatogr. A* 1159, 81-109.
- Hashimoto, W., Momma, K., Katsube, T., Ohkawa, Y., Ishige, T., Kito, M., Utsumi, S., Murata, K. 1998. Safety assessment of genetically engineered potatoes with designed soybean glycinin: Compositional analyses of the potato tubers and digestibility of the newly expressed protein in transgenic potatoes. *J. Sci. Food Agr.* 79, 1607-1612.
- Hayakawa, T., Zhu, Y., Itoh, K., Kimura, Y., Izawa, T., Shimamoto, K., Toriyama, S. 1992. Genetically engineered rice resistant to rice stripe virus, an insect-transmitted virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89, 9865-9869.
- He, X.G. 2000. On-line identification of phytochemical constituents in botanical extracts by combined high-performance liquid chromatographic-diode array detection-mass spectrometric techniques. *J. Chromatogr. A* 880, 203-232.
- Heide, B.R., Drømtorp, S.M., Rudi, K., Heir, E., Holck, A.L. 2008. Determination of eight genetically modified maize events by quantitative, multiplex PCR and fluorescence capillary gel electrophoresis. *Eur. Food Res. Technol.* 227, 1125-1137.

- Henderson, F. G., Chen, K.K. 1950. The pharmacology of lunarine, the alkaloid of lunaria-biennis. *J. Am. Pharm. Assoc.* 39, 516-519.
- Henzel, W.J., Billeci, T.M., Stults, J.T., Wong, S.C., Grimley, C., Watanabe, C. 1993. Identifying proteins from two-dimensional gels by molecular mass searching of peptide fragments in protein sequence databases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, 5011-5015.
- Hernández, M., Pla, M., Esteve, T., Prat, S., Puigdomenech, P., Ferrando, A. 2003. A specific real-time quantitative PCR detection system for event MON810 in maize Yield Gard based on the 30-transgene integration sequence. *Transgenic Res.* 12, 179-218.
- Hernández, M., Río, A., Esteve, T., Prat, S., Pla, M. 2001. A rapeseed-specific gene, acetyl-CoA carboxylase, can be used as a reference for qualitative and Real-Time quantitative PCR detection of transgenes from mixed food samples. *J. Agr. Food Chem.* 49, 3622-3627.
- Hernández, M., Rodríguez-Lázaro, D., Zhang, D., Esteve, T., Pla, M., Prat, S. 2005. Interlaboratory transfer of a PCR multiplex method for simultaneous detection of four genetically modified maize lines: Bt11, MON810, T25, and GA21. *J. Agr. Food Chem.* 53, 3333-3337.
- Hernández-Borges, J., Gonzalez-Hernandez, G., Borges-Miquel, T., Rodríguez-Delgado, M.A. 2005a. Determination of antioxidants in edible grain derivatives from the Canary Islands by capillary electrophoresis. *Food Chem.* 91, 105-111.
- Hernández-Borges, J., Rodríguez-Delgado, M.A., García-Montelongo, F.J., Cifuentes, A. 2005b. Chiral analysis of pollutants and their metabolites by capillary electromigration methods. *Electrophoresis* 26, 3799-3813.
- Herrera-Castillón, E., Jiménez-Fernández, R. 2006. Componentes de la soja de interés en alimentación, nutrición y salud humana. En: "La Salud y la Soja". Edimsa, Madrid.
- Herrero, M., Ibañez, E., Martín-Alvarez, P.J., Cifuentes, A. 2007. Analysis of chiral amino acids in conventional and transgenic maize. *Anal. Chem.* 79, 5071-5077.
- Herring, R.J. 2008. Opposition to transgenic technologies: Ideology, interests and collective action frames. *Nat. Rev.* 9, 458-463.
- Hertkorn, N., Frommberger, M., Schmitt-Kopplin, P., Witt, M., Koch, B., Perdue, E.M. 2008. *Anal. Chem.* 80, 8908-8919.
- Holck, A., Va, M., Didierjean, L., Rudi, K. 2002. 5'-Nuclease PCR for quantitative event-specific detection of the genetically modified Mon810 MaisGard Maize. *Eur. Food Res. Technol.* 214, 449-453.
- Holck, A.L., Drømtorp, S.M., Heir, E. 2009. Quantitative, multiplex ligation-dependent probe amplification for the determination of eight genetically modified maize events. *Eur. Food Res. Technol.* 230, 185-194.

- Hood, L., Perlmutter, R.M. 2004. The impact of systems approaches on biological problems in drug discovery. *Nat. Biotech.* 22, 1215-1217.
- Horvath-Szanics, E., Szabo, Z., Janaky, T., Pauk, J., Hajos, G. 2006. Proteomics as an emergent tool for identification of stress-induced proteins in control and genetically modified wheat lines. *Chromatographia* 63, S143- S147.
- Hübner, P., Studer, E., Lüthy, J. 1999. Quantitation of genetically modified organisms in food. *Nat. Biotech.* 17, 1137-1138.
- Husnik, J.I., Delaquis, P.J., Cliff, M.A., van Vuuren, H.J.J. 2007. Functional analyses of the malolactic wine yeast ML01. *Am. J. Enol. Vitic.* 58, 42-52.
- Husnik, J.I., Volschenk, H., Bauer, J., Colavizza, D., Luo, Z., van Vuuren, H.J.J. 2006. Metabolic engineering of malolactic wine yeast. *Metab. Eng.* 8, 315-323.
- Inaba, Y., Brotherton, J.E., Ulanov, A., Widholm, J.M. 2007. Expression of a feedback insensitive anthranilate synthase gene from tobacco increases free tryptophan in soybean plants. *Plant Cell Rep.* 26, 1763-1771.
- Ioset, J.R., Urbaniak, B., Ndjoko-Ioset, K., Wirth, J., Martin, F., Gruissem, W., Hostettmann, K., Sautter, C. 2007. Flavonoid profiling among wild type and related GM wheat varieties. *Plant Mol. Biol.* 65, 645-654.
- Issaq, H.J., Abbott, E., Veenstra, T.D. 2008. Utility of separation science in metabolomic studies. *J. Sep. Sci.* 31, 1936-1947.
- Ito, H., Fukada, Y., Murata, K., Kimura, A. 1983. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* 153, 163-168.
- Iwashina, T. J. 2000. The structure and distribution of the flavonoids in plants. *Plant Res.* 113, 287-299.
- Jackson, D.A., Symons, R.H., Berg, P. 1972. Biochemical Method for Inserting New Genetic Information into DNA of Simian Virus 40: Circular SV40 DNA Molecules Containing Lambda Phage Genes and the Galactose Operon of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 69, 2904-2909.
- James, C. 2009. Sumario 41. Situación mundial de la comercialización de cultivos biotecnológicos/genéticamente modificados en 2009. International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications. <http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/41/executivesummary/pdf/Brief%2041%20-%20Executive%20Summary%20-%20Spanish.pdf>
- Jobes, D. V., Hurley, D. L., Thien, L. B. 1995. Plant DNA isolation: a method to efficiently remove polyphenolics, polysaccharides, and RNA. *Taxon.* 44, 379-386.
- Jongedijk, E., de Schutter, A.J.M., Stolte, T., van den Elzen, P.J.M., Cornelissen B.J.C. 1992. Increased resistance to potato virus X and preservation of cultivar properties in transgenic potato under field conditions. *Biotechnology* 10, 422-429.

- Jorgenson, J.W., Lukacs, K.D. 1981. Zone electrophoresis in open-tubular glass capillaries. *Anal. Chem.* 53, 1298-1302.
- Kalendar, R. 2010. Java web tools for PCR, in silico PCR, and oligonucleotide assembly and analyses. <http://primerdigital.com/tools>
- Kanehisa, M., Goto, S. 2000. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Res.* 28, 27-30.
- Kim, C.S., Woo, Y.M., Clore, A.M., Burnett, R.J. 2002. Zein protein interactions, rather than the asymmetric distribution of zein mRNAs on endoplasmic reticulum membranes, influence protein body formation in maize endosperm. *Plant Cell* 14, 656-672.
- Klampfl, C.W. 2009. CE with MS detection: A rapidly developing hyphenated technique. *Electrophoresis* 30, S83-S91.
- Kok, E.J., Keijer, J., Kleter, G.A., Kuiper, H.A. 2008. Comparative safety assessment of plant-derived foods. *Regul. Toxicol. Pharm.* 50, 98-113.
- Kok, E.J., Kuiper, H.A. 2003. Comparative safety assessment for biotech crops. *Trends Biotechnol.* 21, 439-444.
- König, A., Cockburn, A., Crevel, R.W.R., Debruyne, E., Grafstroem, R., Hammerling, U., Kimber, I., Knudsen, I., Kuiper, H.A., Peijnenburg, A.A.C.M., Penninks, A.H., Poulsen, M., Schauzu, M., Wal, J.M. 2004. Assessment of the safety of foods derived from genetically modified (GM) crops. *Food Chem. Toxicol.* 42, 1047-1088.
- Köppel, R., Zimmerli, F., Breitenmoser, A. 2010. Multiplex real-time PCR for the simultaneous detection and quantification of DNA from three transgenic rice species and construction and application of an artificial oligonucleotide as reference molecule. *Eur. Food Res. Technol.* 230, 731-736.
- Koziel, M.G., Beland, G.L., Bowman, C., Carozzi, N.B., Crenshaw, R., Crossland, L., Dawson, J., Desai, N., Hill, M., Kadwell, S., Launis, K., Lewis, K., Maddox, D., McPherson, K., Meghji, M.R., Merlin, E., Rhodes, R., Warren, G.G.W., Wright, M., Evola, S.V. 1993. Field performance of elite transgenic maize plants expressing an insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnology* 11, 194-200.
- Kuiper, H.A., Kleter, G.A., Hub, P.J., Kok, E.J. 2001. Assessment of the food safety issues related to genetically modified foods. *Plant J.* 27, 503-528.
- Kuiper, H.A., Kleter, G.A., Noteborn, H.P., Kok, E.J. 2002. Substantial equivalence—An appropriate paradigm for the safety assessment of genetically modified foods? *Toxicology* 181-182, 427-431.
- Kuipers, A.G.J., Soppe, W.J.J., Jacobsen, E., Visser, R.G.F. 1995. Factors affecting the inhibition by antisense RNA of granule-bound starch synthase gene expression in potato. *Mol. Gen. Genet.* 246, 745-755.

- Kusmann, M., Raymond, F., Affolter, M. 2006. OMICS-driven biomarker discovery in nutrition and health. *J. Biotechnol.* 124, 758-787.
- Kyrpides, N. 1999. Genomes Online Database (GOLD 1.0): A monitor of complete and ongoing genome projects world-wide. *Bioinformatics* 15, 773-774.
- Labate, M.T., Ko, K., Ko, Z.W., Pinto, L.S., Real, M.J., Romano, M.R., Barja, P.R., Granell, A., Friso, G., van Wijk, K.J., Brugnoli, E., Labate, C.A. 2004. Constitutive expression of pea Lhcb 1-2 in tobacco affects plant development, morphology and photosynthetic capacity. *Plant Mol. Biol.* 55, 701-714.
- Landry, J., Moureaux, T. 1982. Distribution and amino acid composition of protein fractions in opaque-2 maize grain. *Phytochemistry* 21, 1865-1869.
- Latham, J.R., Wilson, A.K., Steinbrecher, R.A. 2006. The mutational consequences of plant transformation. *J Biomed. Biotech.* 25376, 1-7.
- Le Gall, G., Colquhoun, I.J., Davis, A.L., Collins, G.J., Verhoeven, M.E. 2003. Metabolite profiling of tomato (*Lycopersicon esculentum*) using <sup>1</sup>H NMR spectroscopy as a tool to detect potential unintended effects following a genetic modification. *J. Agr. Food Chem.* 51, 2447-2456.
- Lee, N.K., Son, K.H., Chang, H.W., Kang, S.S., Park, H., Heo, M.Y., Kim, H.P. 2004. Prenylated flavonoids as tyrosinase inhibitors. *Arch. Pharm. Res.* 27, 1132-1135.
- Lehesranta, S.J., Davies, H.V., Shepherd, L.V., Nunan, N., McNicol, J.W., Auriola, S., Koistinen, K.M., Suomalainen, S., Kokko, H.I., Kärenlampi, S.O. 2005. Comparison of tuber proteomes of potato varieties, landraces, and genetically modified lines. *Plant Physiol.* 138, 1690-1699.
- Lilly, M., Lambrechts, M.G., Pretorius, I.S. 2000. Effect of increased yeast alcohol acetyltransferase activity on flavor profiles of wine and distillates. *Appl. Environ. Microb.* 66, 744-753.
- Lobban, P.E. Kaiser, A.D. 1973. Enzymatic End-to-end joining of DNA molecules *J. Mol. Biol.* 78, 453-471.
- Loo, J. A., Edmonds, C. G., Udseth, H. R., Smith, R. D. 1990. Effect of reducing disulfide-containing proteins on electrospray ionization mass spectra. *Anal. Chem.* 62, 693-698.
- López, M.C., García-Cañas, V., Alegre, M.L. 2009. Reversed-phase high-performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry profiling of transgenic and non-transgenic maize for cultivar characterization. *J. Chromatogr. A* 1216, 7222-7228.
- Losey, J.E., Rayor, L.S., Carter, M.E. 1999. Transgenic pollen harms monarch larvae. *Nature* 399, 214-215.
- Lüthy, J. 1999. Detection strategies for food authenticity and genetically modified foods. *Food Control* 10, 359-361.

- Maliyakal, J.E. 1992. An efficient method for isolation of RNA and DNA from plants containing polyphenolics. *Nucleic Acids Res.* 20, 2381.
- Malowicki, S.M.M., Martin, R., Qian, M.C. 2008. Comparison of sugar, acids, and volatile composition in raspberry bushy dwarf virus-resistant transgenic raspberries and the wild type 'Meeker' (*Rubus Idaeus* L.). *J. Agr. Food Chem.* 56, 6648-6655.
- Manetti, C., Bianchetti, C., Bizzarri, M., Casciani, L., Castro, C., D'Ascenzo, G., Delfini, M., Di Cocco, M.E., Lagana, A., Miccheli, A., Motto, M., Conti, F. 2004. NMR based metabonomic study of transgenic maize. *Phytochemistry* 65, 3187-3198.
- Manetti, C., Bianchetti, C., Casciani, L., Castro, C., Di Cocco, M.E., Miccheli, A., Motto, M., Conti, F. 2006. A metabonomic study of transgenic maize (*Zea mays*) seeds revealed variations in osmolytes and branched amino acids. *J. Exp. Bot.* 57, 2613-2625.
- Mannelli, I., Minunni, M., Tombelli, S., Mascini, M. 2003. Quartz crystal microbalance (QCM) affinity biosensor for genetically modified organisms (GMOs) detection. *Biosens. Bioelectron.* 18, 129-140.
- Manzanares, P., Orejas, M., Gil, J.V., De Graaff, L.H., Visser, J., Ramón, D. 2003. Construction of a Genetically Modified Wine Yeast Strain Expressing the *Aspergillus aculeatus* rhaA Gene, Encoding an  $\alpha$ -L-Rhamnosidase of Enological Interest. *Appl. Environ. Microb.* 69, 7558-7562.
- Matsuoka, T., Kawashima, Y., Akiyama, H., Miura, H., Goda, Y., Kusakabe, Y., Isshiki, K., Toyoda, M., Hino, A. 2001. A multiplex PCR method of detecting recombinant DNAs from five lines of genetically modified maize. *J. Food Hyg. Soc. Japan* 42, 24-32.
- Mattoo, A.K., Sobolev, A.P., Neelam, A., Goyal, R.K., Handa, A.K., Segre, A.L. 2006. Nuclear magnetic resonance spectroscopy-based metabolite profiling of transgenic tomato fruit engineered to accumulate spermidine and spermine reveals enhanced anabolic and nitrogen-carbon interactions. *Plant Physiol.* 142, 1759-1770.
- McGhie, T.K., Markham, K.R. 1994. Separation of flavonols by capillary electrophoresis: The effect of structure on electrophoretic mobility. *Phytochem. Anal.* 5, 121-126.
- Mellenthin, O., Galensa, R. 1999. Analysis of polyphenols using capillary zone electrophoresis and HPLC: Detection of soy, lupin, and pea protein in meat products. *J. Agr. Food Chem.* 47, 594-602.
- Mendiola, J.A., Herrero, M., Cifuentes, A., Ibañez, E. 2007. Use of compressed fluids for sample preparation: Food applications. *J. Chromatogr. A* 1152, 234-246.
- Merck Index. 1989. Compound No. 9606. Merck & Co. Whitehouse Station, NJ.

- Meric, B., Kerman, K., Marrazza, G., Palchetti, I., Mascini, M., Ozsoz, M. 2004. Disposable genosensor, a new tool for the detection of NOS terminator, a genetic element present in GMOs. *Food Control* 15, 621-626.
- Michnick, S., Roustan, J.L., Remize, F., Barre, P., Dequin, S. 1997. Modulation of glycerol and ethanol yields during alcoholic fermentation in *Saccharomyces cerevisiae* strains overexpressed or disrupted for GPD1 encoding glycerol 3-phosphate dehydrogenase. *Yeast* 13, 783-793.
- Moreano, F., Ehlert, A., Busch, U., Engel, K.H. 2006. Ligation-dependent probe amplification for the simultaneous event-specific detection and relative quantification of DNA from two genetically modified organisms. *Eur. Food Res. Technol.* 222, 479-485.
- Morino, K., Matsuda, F., Miyazawa, H., Sukegawa, A., Miyagawa, H., Wakasa, K. 2005. Metabolic profiling of tryptophan-overproducing rice calli that express a feedback-insensitive a subunit of anthranilate synthase. *Plant Cell Physiol.* 46, 514-521.
- Morris, C.J., Thompson, J.F. 1962. The isolation and characterization of  $\gamma$ -L-glutamyl-L-tyrosine and  $\gamma$ -L-glutamyl-L-phenylalanine from soybeans. *Biochemistry* 1, 706-709.
- Mounts, T.L., Abidi, S.L., Rennick, K.A. 1996. Effect of genetic modification on the content and composition of bioactive constituents in soybean oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 73, 581-586.
- Mullis, K., Fallona, F.A. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via Polymerase-Catalyzed Chain Reaction. *Method Enzymol.* 155, 335-350.
- Mungur, R., Glass, A.D., Goodenow, D.B., Lightfoot, D.A. 2005. Metabolite fingerprinting in transgenic *Nicotiana tabacum* altered by the *Escherichia coli* glutamate dehydrogenase gene. *J. BioMed. Biotechnol.* 2, 198-214.
- Naqvi, S., Zhu, C., Farre, G., Ramessar, K., Bassie, L., Breitenbach, J., Perez Conesa, D., Ros, G., Sandmann, G., Capell, T., Christou, P. 2009. Transgenic multivitamin corn through biofortification of endosperm with three vitamins representing three distinct metabolic pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 7762-7767.
- National Research Council. 1988. Mapping and Sequencing the Human Genome. National Academy Press, Washington DC.
- National Research Council of the National Academies. 2004. Committee on Identifying and Assessing Unintended Effects of Genetically Engineered Foods on Human Health. Safety of Genetically Engineered Foods: Approaches to Assessing Unintended Health Effects. National Academy Press, Washington DC.
- Nelson, D.L., Cox, M.M. 2000. *Lehninger Principles of Biochemistry*. Worth Publishers, New York.



- Nicholson, J.K., Connelly, J., Lindon, J.C., Holmes, E. 2002. Metabonomics: A platform for studying drug toxicity and gene function. *Nat. Rev. Drug Discov.* 1, 153-161.
- Nicoletti, I., De Rossi, A., Giovino, G., Corradini, D. 2007. Identification and quantification of stilbenes in fruits of transgenic tomato plants (*Lycopersicon esculentum* Mill.) by reversed phase HPLC with photodiode array and mass spectrometry detection. *J. Agr. Food Chem.* 55, 3304-3311.
- Nordstrom, A., O'Maille, G., Qin, C., Siuzdak, G. 2006. Nonlinear data alignment for UPLC-MS and HPLC-MS based metabolomics: Quantitative analysis of endogenous and exogenous metabolites in human serum. *Anal. Chem.* 78, 3289-3295.
- Ogunjimi, A.A., Choudary, P.V. 1999. Adsorption of endogenous polyphenols relieves the inhibition by fruit juices and fresh produce of immuno-PCR detection of *Escherichia coli* 0157: H7. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 23, 213-220.
- Padgett, S.R., Kolacz, K.H., Delannay, X., Re, D.B., LaValee, B.J., Tinius, C.N., Rhodes, W.K., Otero, Y.I., Barry, G.F., Eichholtz, D.A., Peschse, V.M., Nida, D.L., Taylor, N.B., Kishore, G.M. 1995. Development, identification, and characterization of a glyphosate-tolerant soybean line. *Crop Sci.* 35, 1451-1461.
- Padgett, S.R., Taylor, N.B., Nida, D.L., Bailey, M.R., McDonald, J., Holden, L.R., Fuchs, R.L. 1996. The composition of glyphosate-tolerant soybean seeds is equivalent to that of conventional soybeans. *J. Nutr.* 126, 702-716.
- Petersson, P., Jornten-Karlsson, M., Stalebro, M. 2003. Direct coupling of micellar electrokinetic chromatography to mass spectrometry using a volatile buffer system based on perfluorooctanoic acid and ammonia. *Electrophoresis* 24, 999-1007.
- Piccioni, F., Capitani, D., Zolla, L., Mannina, L. 2009. NMR Metabolite profiling of transgenic maize with the Cry1A(b) gene. *J. Agr. Food Chem.* 57, 6041-6049.
- Potrykus, I. 2001. Golden Rice and Beyond. *Plant Physiol.* 125, 1157-1161.
- Querol, A., Barrio, E., Huerta, T., Ramon, D. 1992. Molecular monitoring of wine fermentations conducted by active dry yeast strains. *Appl. Environ. Microb.* 58, 2948-2953.
- Raeymakers, L. 1993. Quantitative PCR: Theoretical considerations with practical implications. *Anal. Biochem.* 214, 582-585.
- Rávelo-Pérez, L.M., Asensio-Ramos, M., Hernández-Borges, J., Rodríguez-Delgado, M.A. 2009. Recent food safety and food quality applications of CE-MS. *Electrophoresis* 30, 1624-1646.
- Reglamento (CE) Nº 1829/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo de 22 de septiembre de 2003 sobre alimentos y piensos modificados genéticamente. *Diario Oficial de la Unión Europea*, 18.10.2003, L268/1.

- Reglamento (CE) N° 1830/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo de 22 de septiembre de 2003 relativo a la trazabilidad y al etiquetado de organismos modificados genéticamente y a la trazabilidad de los alimentos y piensos producidos a partir de éstos, y por el que se modifica la Directiva 2001/18/CE. Diario Oficial de la Unión Europea, 18.10.2003, L268/24.
- Reglamento (CE) N° 258/97 del Parlamento Europeo y del Consejo de 27 de enero de 1997 sobre nuevos alimentos y nuevos ingredientes alimentarios. Diario Oficial de la Unión Europea, 14.2.97, L43/1.
- Remize, F., Sablayrolles, J.M., Dequin, S. 2000. Re-assessment of the influence of yeast strain and environmental factors on glycerol production in wine. *J. Appl. Microb.* 88, 371-378.
- Riddick, E.W., Dively, G., Barbosa, P. 1998. Effect of a seed-mix deployment of Cry3A-transgenic and nontransgenic potato on the abundance of *Lebia grandis* (coleoptera: carabidae) and *Coleomegilla maculata* (coleoptera: coccinellidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 91, 647-653.
- Ririe, K.M., Rasmussen, R.P., Wittwer, C.T. 1997. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.* 254, 154-160.
- Rizzi, A.M., Cladowa-Runge, S., Jonsson, H., Osla, S. 1995. Enantiomeric resolution of derivatized DL-amino acids by high-performance liquid chromatography using a  $\beta$ -cyclodextrin chiral stationary phase: A comparison between derivatization labels. *J. Chromatogr. A* 710, 287-295.
- Robinson, C. 2002. Genetic modification technology and food: Consumer Health and Safety. In: ILSI Europe Concise Monograph Series, 1-45.
- Rocco, M., Corrado, G., Arena, S., D'Ambrosio, C., Tortiglione, C., Sellaroli, S., Marrad, M., Raob, R., Scaloni A. 2008. The expression of tomato prosystemin gene in tobacco plants highly affects host proteomic repertoire. *J. Proteomics* 71, 176-185.
- Rodríguez-Nogales, J.M., Cifuentes, A., García, M.C., Marina, M.L. 2010. Improved methodology for the characterisation of transgenic Bt-11 maize cultivars using RP-HPLC profiles of albumin, globulin, prolamin, and glutelin protein fractions and chemometric analysis. *Food Chem.* 120, 1229-1237.
- Roessner, U., Luedemann, A., Brust, D., Fiehn, O., Linke, T., Willmitzer, L., Fernie, A.R. 2001. Metabolic profiling allows comprehensive phenotyping of genetically or environmentally modified plant systems. *Plant Cell* 13, 11-29.
- Roessner-Tunali, U., Hegemann, B., Lytovchenko, A., Carrari, F., Bruedigam, C., Granot, D., Fernie, A.R. 2003. Metabolic profiling of transgenic tomato plants overexpressing hexokinase reveals that the influence of hexose phosphorylation diminishes during fruit development. *Plant Physiol.* 133, 84-99.

- Rozen, S., Skaletsky, H.J. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology. Humana Press, Totowa, NJ.
- Ruebelt, M.C., Leimgruber, N.K., Lipp, M., Reynolds, T.L., Nemeth, M.A., Astwood, J.D., Engel, K.H., Jany, K.D. 2006. Application of two-dimensional gel electrophoresis to interrogate alterations in the proteome of genetically modified crops. 1. Assessing analytical validation. *J. Agr. Food Chem.* 54, 2154-2161.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Stephen, J.S., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., Arnheim, N. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230, 1350-1354.
- Salinas, F., Garrido, D., Ganga, A., Veliz, G., Martínez, C. 2009. Taqman real-time PCR for the detection and enumeration of *Saccharomyces cerevisiae* in wine. *Food Microbiol.* 26, 328-332.
- Sánchez-Torres, P., González-Candelas, L., Ramón, D. 1996. Expression in a wine yeast strain of the *Aspergillus niger* *abfB* gene. *FEMS Microbiol. Lett.* 145, 189-194.
- Savazzini, F., Martinelli, L. 2006. DNA analysis in wines: Development of methods for enhanced extraction and real-time polymerase chain reaction quantification. *Anal. Chim. Acta* 563, 274-282.
- Sázelová, P., Kašička, V., Ibáñez, E., Cifuentes, A. 2010. Extraction and separation of water-soluble proteins from *Bacillus thuringiensis*-transgenic and non-transgenic maize species by CZE. *J. Sep. Sci.* 32, 3801-3808.
- Schmitt-Kopplin, P., Frommberger, M. 2003. Capillary electrophoresis – Mass spectrometry: 15 years of developments and applications. *Electrophoresis* 24, 3837-3867.
- Scossa, F., Laudencia-Chingcuanco, D., Anderson, O.D., Vensel, W.H., Lafiandra, D., D'Ovidio, R., Masci, S. 2008. Comparative proteomic and transcriptional profiling of a bread wheat cultivar and its derived transgenic line overexpressing a low molecular weight glutenin subunit gene in the endosperm. *Proteomics* 8, 2948-2966.
- Shachar-Hill, Y., Pfeffer, P. E., Germann, M.W. 1996. Following plant metabolism in vivo and in extracts with heteronuclear two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Anal. Biochem.* 243, 110-118.
- Shanahan, D., Stokes, P., Burns, M., Harris, N. 2007. A novel method for the detection of Roundup Ready<sup>TM</sup> soya using liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry. *Eur. Food Res. Technol.* 225, 483-491.

- Shepherd, L.V.T., McNicol, J.W., Razzo, R., Taylor, M.A., Davies, H.V. 2006. Assessing the potential for unintended effects in genetically modified potatoes perturbed in metabolic and developmental processes. Targeted analysis of key nutrients and anti-nutrients. *Transgenic Res.* 15, 409- 425.
- Shewmaker, C.K., Sheehy, J.A., Daley, M., Colburn, S., Ke, D.Y. 1999. Seed-specific overexpression of phytoene synthase: Increase in carotenoids and other metabolic effects. *Plant J.* 20, 401-412.
- Shin, Y.M., Park, H.J., Yim, S.D., Baek, N.I., Lee, C.H., An, G., Woo, Y.M. 2006. Transgenic rice lines expressing maize C1 and R-S regulatory genes produce various flavonoids in the endosperm. *Plant Biol. J.* 4, 303-315.
- Simó, C., Barbas, C., Cifuentes, A. 2003. Chiral electromigration methods in food analysis. *Electrophoresis* 24, 2431-2441.
- Simó, C., Domínguez-Vega, E., Marina, M.L., García, M.C., Dinelli, G., Cifuentes, A. 2010a. CE-TOF MS analysis of complex protein hydrolyzates from genetically modified soybeans - A tool for foodomics. *Electrophoresis* 31, 1175-1183.
- Simó, C., García-Cañas, V., Cifuentes, A. 2010b. Chiral CE-MS. *Electrophoresis* 31, 1442-1456.
- Simó, C., Rizzi, A., Barbas, C., Cifuentes, A. 2005. Chiral capillary electrophoresis-mass spectrometry of amino acids in foods. *Electrophoresis* 26, 1432-1441.
- Simón, M.C., Gray, D.I., Cook, N. 1996. DNA extraction and PCR methods for the detection of *Listeria monocytogenes* in cold-smoked salmon. *Appl. Environ. Microb.* 62, 822-824.
- Siret, R., Boursiquot, J.M., Merle, M.H., Cabanis, J.C., This, P. 2000. Toward the authentication of varietal wines by the analysis of grape (*Vitis vinifera* L.) residual DNA in must and wine using microsatellite markers. *J. Agr. Food Chem.* 48, 5035-5040.
- Siret, R., Gigaud, O., Rosec, J.P., This, P. 2002. Analysis of grape *Vitis vinifera* L. DNA in must mixtures and experimental mixed wines using microsatellite markers. *J. Agr. Food Chem.* 50, 3822-3827.
- Sobolev, A.P., Testone, G., Santoro, F., Nicolodi, C., Iannelli, M.A., Amato, M.E., Ianniello, A., Brossio, E. Gianinno D., Mannina, L. 2010. Quality traits of conventional and transgenic lettuce (*Lactuca sativa* L.) at harvesting by NMR metabolic profiling. *J. Agr. Food Chem.* 58, 6928-6936.
- Song, E.J., Babar, S.M., Oh, E., Hasan, M.N., Hong, H.M., Yoo, Y.S. 2008. CE at the omics level: Towards systems biology-An update. *Electrophoresis* 29, 129-142.
- Soria, A.C. 2006. Metabolómica y cromatografía. *Boletín Sociedad Española de Cromatografía y Técnicas Afines* 27, 8-17.

- Stave, J.W. 2002. Protein immunoassay methods or detection of biotech crops: Applications, Limitations, and practical considerations. *J. AOAC Int.* 85, 780-786.
- Stephens, F.B., Constantin-Teodosiu, D., Greenhaff, P.L. 2007. New insights concerning the role of carnitine in the regulation of fuel metabolism in skeletal muscle. *J. Physiol.* 581, 431-444.
- Stutz, H. 2005. Advances in the analysis of proteins and peptides by capillary electrophoresis with matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray-mass spectrometry detection. *Electrophoresis* 26, 1254-1290.
- Suhre, K., Schmitt-Kopplin, P. 2008. MassTRIX: Mass Translator into pathways. *Nucleic Acids Res.* 36, W481-W484.
- Suresh Babu, C.V., Song, E.J., Babar, S.M.E., Wi, M.H., Yoo, Y.S. 2006. Capillary electrophoresis at the omics level: Towards systems biology. *Electrophoresis* 27, 97-110.
- Tahara, S., Orihara, S., Ingham, J.L., Mizutani. 1989. Seventeen isoflavonoids from *Lupinus albus* roots. *J. Phytochemistry* 28, 901-911.
- Tai, T.H., Dahlbeck, D., Clark, E.T., Gajiwala, P., Pasion, R., Whalen, M.C., Stall, R.E., Staskawicz, B.J. 1999. Expression of the *Bs2* pepper gene confers resistance to bacterial spot disease in tomato. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 96, 14153-14158.
- Takahashi, H., Hayashi, M., Goto, F., Sato, S., Soga, T., Nishioka, T., Tomita, M., Kawai-Yamada, M., Uchimiya, H. 2006. Evaluation of metabolic alteration in transgenic rice overexpressing dihydroflavonol-4-reductase. *Ann. Bot.* 98, 819-825.
- Takahashi, H., Hotta, Y., Hayashi, M., Kawai-Yamada, M., Komatsu, S., Uchimiya, H. 2005. High throughput metabolome and proteome analysis of transgenic rice plants (*Oryza sativa* L.). *Plant Biotech.* 22, 47-50.
- Tanaka, Y., Otsuka, K., Terabe, S. 2000. Separation of enantiomers by capillary electrophoresis-mass spectrometry employing a partial filling technique with a chiral crown ether. *J. Chromatogr. A* 875, 323-330.
- Tanaka, Y., Otsuka, K., Terabe, S. 2003. Evaluation of an atmospheric pressure chemical ionization interface for capillary electrophoresis-mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 30, 1889-1895.
- Tanaka, Y., Terabe, S. 1995. Partial separation zone technique for the separation of enantiomers by affinity electrokinetic chromatography with proteins as chiral pseudo-stationary phases. *J. Chromatogr. A* 694, 277-284.
- Terry, C.F., Harris, N. 2001. Event-specific detection of Roundup Ready Soja using two different real time PCR detection chemistries. *Eur. Food Res. Technol.* 213, 425-431.

- Thomson, J. 2003. Genetically modified food crops for improving agricultural practice and their effects on human health. *Trends Food Sci. Technol.* 14, 210-228.
- Timms, J.F., Cramer, R. 2008. Difference gel electrophoresis. *Proteomics* 8, 4886-4897.
- Trinchant, J. C., Boscari, A., Spennato, G., Van de Syde, G., Le Rudulier, D. 2004. Proline betaine accumulation and metabolism in alfalfa plants under sodium chloride stress. Exploring its compartmentalization in nodules. *Plant Physiol.* 135, 1583-1594.
- Tsai, Y., Olson, B.H. 1992. Rapid method for separation of bacterial DNA from humic substances in sediments for polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 2292-2295.
- Vaidyanathan, S., Kell, D. B., Goodacre, R. 2004. Selective detection of proteins in mixtures using electrospray ionization mass spectrometry: Influence of instrumental settings and implications for proteomics. *Anal. Chem.* 76, 5024-5032.
- Väitilingom, M., Pijnenburg, H., Gendre, F., Brignon, P. 1999. Real-time quantitative PCR detection of genetically modified maximizer maize and roundup ready soybean in some representative foods. *J. Agr. Food Chem.* 47, 5261-5266.
- Van Duijn, G., Van Biert, R., Bleeker-Marcelis, H., Van Boeijen, I., Adan, A.J., Jhakriel, S., Hessing, M. 2002. Detection of genetically modified organisms in foods by protein- and DNA-based techniques: Bridging the methods. *J. AOAC Int.* 85, 787-791.
- Van Krevelen, D.W. 1950. Graphical-statistical method for the study of structure and reaction processes of coal. *Fuel* 29, 269-284.
- Vergragt, P.J., Brown, H.S. 2008. Genetic engineering in agriculture new approaches for risk management through sustainability reporting. *Technol. Forecast Soc.* 75, 783-798.
- Viant, M.R., Rosenblum, E.S., Tjeerdema, R.S. 2003. NMR-Based metabolomics: A powerful approach for characterizing the effects of environmental stressors on organism health. *Environ. Sci. Technol.* 37, 4982-4989.
- Von Götz, F. 2010. See what you eat-broad GMO screening with microarrays. 2010. *Anal. Bioanal. Chem.* 396, 1961-1967.
- Wang, Y., Tang, H., Nicholson, J.K., Hylands, P.J., Sampson, J., Holmes, E. 2005. A metabonomic strategy for the detection of the metabolic effects of chamomile (*Matricaria recutita* L.) ingestion. *J. Agr. Food Chem.* 53, 191-196.
- Wei, Q.K., Jone, W.W., Fang, T.J. 2004. Study on isoflavones isomers contents in Taiwan's soybean and GM soybean. *J. Food Drug Anal.* 12, 324-331.
- Whitman, D.F., Dunbar, S.A. 2008. Real-time polymerase chain reaction detection methods. *Recent Pat. DNA Gene Sc.* 2, 20-26.

- Wilson, I.G. 1997. Inhibition and Facilitation of Nucleic Acid Amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3741-3751.
- Wishart, D.S., Knox, C., Guo, A.C., Eisner, R., Young, N., Gautam, B., Hau, D.D., Psychogios, N., Dong, E., Bouatra, S., Mandal, R., Sinelnikov, I., Xia, J., Jia, L., Cruz, J.A., Lim, E., Sobsey, C.A., Shrivastava, S., Huang, P., Liu, P., Fang, L., Peng, J., Fradette, R., Cheng, D., Tzur, D., Clements, M., Lewis, A., de Souza, A., Zuniga, A., Dawe, M., Xiong, Y., Clive, D., Greiner, R., Nazyrova, A., Shaykhutdinov, R., Li, L., Vogel, H.J., Forsythe, I. 2009. HMDB: a knowledgebase for the human metabolome. *Nucleic Acids Res.* 37, D603-610.
- Wishart, D.S., Tzur, D., Knox, C., Eisner, R., Guo, A.C., Young, N., Cheng, D., Jewell, K., Arndt, D., Sawhney, S., Fung, C., Nikolai, L., Lewis, M., Coutouly, M.-A., Forsythe, I., Tang, P., Shrivastava, S., Jeroncic, K., Stothard, P., Amegbey, G., Block, D., Hau, D.D., Wagner, J., Miniaci, J., Clements, M., Gebremedhin, M., Guo, N., Zhang, Y., Duggan, G.E., MacInnis, G.D., Weljie, A.M., Dowlatabadi, R., Bamforth, F., Clive, D., Greiner, R., Li, L., Marrie, T., Sykes, B.D., Vogel, H.J., Querengesser, L. 2007. HMDB: the Human Metabolome Database. *Nucleic Acids Res.* 35, D521-526.
- Wittmer, C.T., Ririe, K.M., Andrew, R.V., David, D.A., Gundry, R.A., Balis, U.J. 1997. The lightcycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. *Biotechniques* 22, 176-181.
- Wolfenbarger, L.L., Phifer, P.R. 2000. The ecological risk and benefits of genetically engineered plants. *Science* 290, 2088-2093.
- Xu, J., Zhu, S., Miao, H., Huang, W., Qiu, M., Huang, Y., Fu, X., Li, Y. 2007. Event-specific detection of seven genetically modified soybean and maizes using multiplex-PCR coupled with oligonucleotide microarray. *J. Agr. Food Chem.* 55, 5575-5579.
- Ye, X., Al-Babili, S., Kloti, A., Zhang, J., Lucca, P., Beyer, P., Potrykus, I. 2000. Engineering the provitamin A (β-carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. *Science* 287, 303-305.
- Yin, X.-B., Li, Y., Yan, X.-P. 2008. CE-ICP-MS for studying interactions between metals and biomolecules. *TRAC - Trends Anal. Chem.* 27, 554-565.
- Young, C., Burghoff, R.L., Keim, L.G., Minak-Bernero, V., Lute, J.R., Hinton, S.M. 1993. Polyvinylpyrrolidone-agarose gel electrophoresis purification of polymerase chain reaction-amplifiable DNA from soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 1972-1974.
- Yum, H.Y., Lee, S.Y., Lee, K.E., Sohn, M.H., Kim, K.E. 2005. Genetically modified and wild soybeans: An immunologic comparison. *Allergy Asthma Proc.* 26, 210-216.
- Zawirska-Wojtasiak, R., Gonslinski, M., Szwacka, M., Gajc-Wolska, J., Mildner-Szkudlarz, S. 2009. Aroma evaluation of transgenic, thaumatin II producing cucumber fruits. *J. Food Sci.* 74, 204-210.

- Zeitler, R., Pietsch, K., Waiblinger, H.U. 2002. Validation of real-time PCR methods for the quantification of transgenic contamination in rape seed. *Eur. Food Res. Technol.* 2143, 346-351.
- Zhang, X., Yap, Y., Wei, D., Chen, G., Chen, F. 2008. Novel omics technologies in nutrition research. *Biotechnol. Adv.* 26, 169-176.
- Zhou, J., Ma, C., Xu, H., Yuan, K., Lu, X., Zhu, Z., Wu, Y., Xu, G. 2009. Metabolic profiling of transgenic rice with cryIAC and sck genes: An evaluation of unintended effects at metabolic level by using GC-FID and GC-MS. *J. Chromatogr. B* 877, 725-732.
- Zhou, Y., Li, Y., Pei, X. 2007. Determination of genetically modified soybean by multiplex PCR and CGE with LIF detection. *Chromatographia* 66, 691-696.
- Zolla, L., Rinalducci, S., Antonioli, P., Righetti, P.G. 2008. Proteomics as a complementary tool for identifying unintended side effects occurring in transgenic maize seeds as a result of genetic modifications. *J. Proteome Res.* 7, 1850-1861.
- Zollner, P., Leitner, A., Berner, D., Kleinova, M., Jodlbauer, J., Mayer, B.X., Lindner, W. 2003. Improving LC-MS/MS analyses in complex food matrices, part I - Sample preparation and chromatography. *LC-GC Eur.* 16, 163-171.



**ANEXO: PUBLICACIONES  
RELACIONADAS (RELATED PAPERS)**



## LISTA DE PUBLICACIONES

MS-based analytical methodologies for genetically modified crops characterization. *Mass Spectrom. Rev.* DOI 10.1002/mas.20286. (CAPÍTULO I)

Aplicaciones ómicas de la electroforesis capilar. *Boletín Secyta* (Sociedad Española de Cromatografía y Técnicas Afines), 2008, 29, 44-58. (CAPÍTULO I)

Fast and sensitive detection of genetically modified yeasts. To be submitted. (CAPÍTULO III)

Time of flight vs ion trap mass spectrometry coupled to capillary electrophoresis to analyze intact proteins. *J. Sep. Sci.*, 2008, 31A, 1810-1818. (CAPÍTULO IV)

Modified cyclodextrins for fast and sensitive chiral-capillary electrophoresis-mass spectrometry. *Electrophoresis*, 2009, 30, 1734-1742. (CAPÍTULO V)

Transgenic vs conventional soybean: a comparative metabolomic study using capillary electrophoresis-time of flight-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 2008, 1195A, 164-173. (CAPÍTULO VI)

Capillary electrophoresis-time of flight-mass spectrometry for comparative metabolomics of transgenic vs conventional maize. *Anal. Chem.*, 2008, 80, 6329-6335. (CAPÍTULO VII)

Metabolomics of transgenic food combining Fourier transform-ion cyclotron resonance-mass spectrometry, capillary electrophoresis-mass spectrometry and pressurized liquid extraction. *J. Chromatogr. A*, 2009, 1216, 7314-7323. (CAPÍTULO VII)